

**Über die Wirkung von Edein und  
mutativer Edeinresistenz  
auf die genetische Rekombination  
bei *Neurospora crassa***

Maria Leonor Hermenegildo Teles Grilo

1976



Über die Wirkung von Edein und mutativer Edeinresistenz  
auf die genetische Rekombination bei *Neurospora crassa*

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereiches Biologie  
der Ludwigs-Maximilians-Universität, München

vorgelegt von

Maria Leonor Hermenegildo Teles Grilo

aus

Chaves, Portugal

1975

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von  
Juni 1971 bis Juni 1975 am genetischen Institut der  
Universität München unter Anleitung von Professor  
Dr. W. Klingmüller durchgeführt.



1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Klingmüller

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H.-J. Becker

Tag der mündlichen Prüfung: 4.6.1976

Meinen Eltern in Dankbarkeit



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41553810\\_0023](https://archive.org/details/IA41553810_0023)

## INHALTSVERZEICHNIS

|     |                                                                                  |        |
|-----|----------------------------------------------------------------------------------|--------|
| A.  | EINLEITUNG .....                                                                 | 1 - 5  |
| B.  | MATERIAL UND METHODEN .....                                                      | 6 - 20 |
| 1.  | Stämme .....                                                                     | 6      |
| 2.  | Nährboden und Puffer .....                                                       | 6      |
| 3.  | Besondere Chemikalien .....                                                      | 8      |
| 4.  | Anzuchtverfahren zur Gewinnung von<br>Konidien .....                             | 9      |
| 5.  | Herstellen von Konidiensuspensionen .....                                        | 9      |
| 6.  | Plattieren von Konidien .....                                                    | 9      |
| 7.  | Induktion edeinresistenter Mutanten<br>mit NTG .....                             | 10     |
| 8.  | Edeinresistenz-Test .....                                                        | 10     |
| 9.  | Ermittlung der Auxotrophien .....                                                | 11     |
| 10. | Kreuzungen .....                                                                 | 12     |
| 11. | Prüfung des Paarungstyps .....                                                   | 14     |
| 12. | Herstellen von Heterokaryen .....                                                | 14     |
| 13. | Prüfung des Genotyps gegenüber dem<br>Phänotyp .....                             | 14     |
| 14. | Nukleaseaktivitätsbestimmung .....                                               | 15     |
| 15. | Messung zur UV-Inaktivierung, Photo-<br>reaktivierung und Dunkel-Reparatur ..... | 18     |

|     |                                   |    |
|-----|-----------------------------------|----|
| 16. | Bestimmung des Zellvolumens ..... | 19 |
| 17. | Kernfärbung .....                 | 20 |
| 18. | Statistische Sicherung .....      | 20 |

|    |                  |         |
|----|------------------|---------|
| C. | ERGEBNISSE ..... | 21 - 77 |
|----|------------------|---------|

|       |                                                                                                           |    |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I.    | Herstellung edeinresistenter Mutanten<br>sowie ihre genetische Analyse .....                              | 21 |
| I.1.  | Gewinnung von stabilen edeinresisten-<br>ten Mutanten .....                                               | 21 |
| I.2.  | Kartierung der stabilen edeinresi-<br>stenten Mutanten .....                                              | 25 |
| I.3.  | Heterokaryon-Teste .....                                                                                  | 29 |
| I.4.  | Variabilität des Phänotyps .....                                                                          | 31 |
| I.5.  | Häufigkeit des resistenten Phänotyps<br>unter verschiedenen Bedingungen .....                             | 32 |
| II.   | Einfluß der Edeinresistenz bzw. des<br>Edeins auf die intergene und inter-<br>allele Rekombination .....  | 36 |
| II.1. | Intergene bzw. interallele Rekombina-<br>tionshäufigkeit bei Kreuzungen edein-<br>sensibler Stämme .....  | 36 |
| II.2. | Intergene und interallele Rekombina-<br>tionshäufigkeit bei Kreuzungen edein-<br>resistenter Stämme ..... | 36 |
| II.3. | Einfluß von Edein auf die Rekombina-<br>tionshäufigkeit bei edeinsensiblen<br>Stämmen .....               | 38 |

|           |                                                                                                                                      |    |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| II.4.     | Einfluß von Edein auf die Rekombinationshäufigkeit bei edeinresistenten Stämmen .....                                                | 39 |
| II.5.     | Klassifizierung der Rekombinanten .....                                                                                              | 43 |
| III.      | Versuche zur Ermittlung der molekularen Ursachen der Effekte .....                                                                   | 48 |
| III.1.    | Nukleaseaktivitätsbestimmung bei edeinresistenten Mutanten .....                                                                     | 48 |
| III.1.a.  | Myzelwachstum edeinresistenter Mutanten in RNS $\nabla$ haltigem Medium .....                                                        | 49 |
| III.1.b.  | Nukleaseaktivitätsbestimmung durch Messung des Abbauens von DNS in Zell-extrakten .....                                              | 51 |
| III.2.    | Photoreaktivierung und Dunkel-Reparatur bei edeinresistenten Mutanten in Abwesenheit bzw. Gegenwart von Edein .....                  | 56 |
| III.2.a.  | Photoreaktivierung und Dunkel-Reparatur des Wildtyps nach Plattierung ohne bzw. mit Edein .....                                      | 56 |
| III.2.b.  | Photoreaktivierung und Dunkel-Reparatur des Wildtyps, gezüchtet auf edeinhaltigem Medium, nach Plattierung ohne bzw. mit Edein ..... | 57 |
| III.2.c.α | Photoreaktivierung und Dunkel-Reparatur der edeinresistenten Mutanten nach Plattierung ohne bzw. mit Edein .....                     | 61 |

|           |                                                                                                                                                       |    |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| III.2.c.β | Photoreaktivierung und Dunkel-Reparatur der edeinresistenten Mutanten, gezüchtet auf edeinhaltigem Medium, nach Plattierung ohne bzw. mit Edein ..... | 63 |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|    |                  |         |
|----|------------------|---------|
| D. | DISKUSSION ..... | 77 - 84 |
|----|------------------|---------|

|    |                       |         |
|----|-----------------------|---------|
| E. | ZUSAMMENFASSUNG ..... | 85 - 88 |
|----|-----------------------|---------|

|    |                            |         |
|----|----------------------------|---------|
| F. | LITERATURVERZEICHNIS ..... | 89 - 96 |
|----|----------------------------|---------|

## A. EINLEITUNG

Edein ist ein Oligopeptid mit dem Molekulargewicht  $1,6 \times 10^3$ . Es gehört zur Gruppe der Antibiotika, die von *Bacillus brevis* gebildet werden. Das käufliche Präparat setzt sich aus 2 verschiedenen Bestandteilen zusammen, nämlich Edein A und B (s. Abb. 1). Sie werden als Gemisch vom Stamm  $V_m^4$  produziert (Borowski, Chmara und Jareczek-Morawska, 1966; Kurylo-Borowska und Tatum, 1966). Edein reagiert sehr alkalisch, ist in wäßriger Lösung farblos und ist in den meisten organischen Lösungsmitteln nicht löslich.

Edein A und B enthalten je 5 Aminosäuren (Glycin, Isoserin,  $\alpha$ ,  $\beta$ -Diaminopropionsäure, 2,6-Diamino-7-Hydroxyazelaensäure und  $\beta$ -Tyrosin) und eine organische Base (Spermidin in Edein A und Guanylspermidin in Edein B) (Hettinger, Kurylo-Borowska und Craig, 1968; Hettinger und Craig, 1970).

Edein A bzw. Edein B sind Racemate aus Edeine  $A_1$ ,  $A_2$  bzw.  $B_1$ ,  $B_2$ . Die Komponenten  $A_2$  und  $B_2$  sind Produkte einer intramolekularen Isomerisation aus Edein  $A_1$  und  $B_1$  (Hettinger und Craig, 1970).

Edein A und B besitzen ein breites Wirkungsspektrum. Sie hemmen das Wachstum Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien von Mykoplasmen, Pilzen, Hefen und Säuger-Neoplasmen in Gewebekultur (Kurylo-Borowska, 1962).

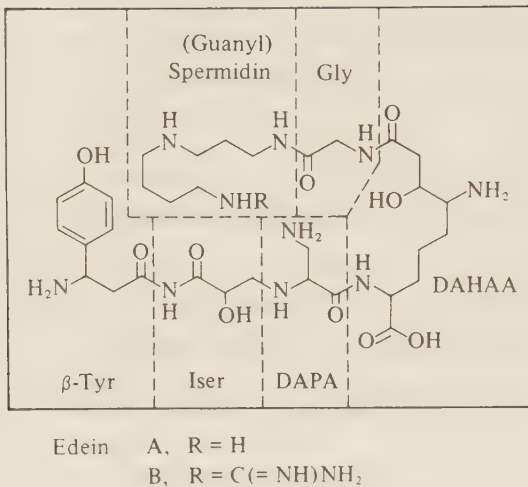


Abb. 1. Chemische Struktur von Edeine A und Edeine B  
(nach Kurylo-Borowska, 1975)

Bei *Escherichia coli* wirkt Edeine hemmend auf die DNS-Synthese (Kurylo-Borowska, 1964). Ebenso wurde für *E. coli* eine Hemmung der Protein-Synthese gefunden, wobei eine 10-fach höhere Konzentration gegenüber der Hemmung der DNS-Synthese nötig ist (Hierowski und Kurylo-Borowska, 1965; Obrig, Irvin, Culp und Hardesty, 1971). Eine Wirkung auf die RNS-Synthese konnte dagegen nicht nachgewiesen werden (Kurylo-Borowska und Szer, 1972). Außer der Hemmung der DNS-Synthese bei *E. coli* konnte hier auch ein Einfluß von Edeine auf die genetische Rekombination beobachtet werden.

Wenn Edein bei Edeinresistenz des Spender-Stammes vor bzw. während der Konjugation geboten wurde, ergab sich eine Steigerung der Rekombinationshäufigkeit (Piekarowicz, Groniowska und Kunicki-Goldfinger, 1969; Wlodarczyk, Najer, Piekarowicz und Kunicki-Goldfinger, 1969). Ähnliche Wirkungen von Edein wurden auch für den Schimmelpilz *Neurospora crassa* beschrieben. So haben Wagenmann, Klingmüller und Neupert (1974) eine Hemmung der DNS-, Protein- und RNS-Synthese durch Edein nachgewiesen. Ferner wurde von Reetz und Klingmüller (1973) eine Erhöhung der intergenen Rekombinationshäufigkeit in Gegenwart des Antibiotikums beschrieben. Mit Hilfe dieses Antibiotikums und geeigneter edeinresistenter Mutanten sollten daher neue Einblicke in die während der genetischen Rekombination ablaufenden Vorgänge gewonnen werden können. Für solche Untersuchungen, in Fortsetzung der bereits zitierten aus der hiesigen Arbeitsgruppe, ist der Schimmelpilz *Neurospora crassa* besonders geeignet. Um bei *Neurospora* die Wirkung von Edein, wie auch etwaiger Mutationen zur Edeinresistenz auf die genetische Rekombination erfassen zu können, war es zunächst nötig, edeinresistente Mutanten zu gewinnen und sie genetisch zu charakterisieren. Diesbezügliche Versuche sind im ersten Teil der vorliegenden Arbeit beschrieben.

Anschließend sollten geeignete auxotrophe Stämme von *Neurospora crassa* für eine Untersuchung sowohl der intergenen als auch der interallelen Rekombination eingesetzt werden. Es wurden dafür Stämme ausgewählt, die in 2 verschiedenen Allelen des *pan-2* Locus ( $B_3$  und  $B_5$ ) mutiert sind und zu-

sätzlich Außenmarken tragen. Sie gestatten die Analyse bei-  
der Rekombinationstypen in ein und der selben Kreuzung.  
Diese Stämme waren von Case und Giles (1958) sowie von  
Threlkeld, Newcombe und Mylyk (1969) bereits genau cha-  
rakterisiert worden. Durch Tetradenanalyse haben die Auto-  
ren gezeigt, daß bei Kreuzungen zwischen ihnen der größte  
Teil der dabei erhaltenen pan<sup>+</sup> Rekombinanten auf Gen-Kon-  
version zurückgehen. Untersuchungen mit diesen Stämmen,  
die auf eine Beeinflussung der Rekombination durch Edein  
bzw. die Mutation zur Edeinresistenz zielen, sind im 2.  
Teil der vorliegenden Arbeit zusammengestellt.

Nach Einkreuzung der Mutation zur Edeinresistenz sollten 4  
verschiedene Kreuzungen durchgeführt werden, und zwar:  
a) zwischen edeinsensiblen Stämmen (als Kontrolle); b) zwi-  
schen edeinresistenten Stämmen (um die Wirkung der Mutation  
zur Edeinresistenz zu prüfen); c) zwischen edeinsensiblen  
Stämmen in Gegenwart von Edein (um den Einfluß des Antibio-  
tikums zu prüfen) und d) zwischen edeinresistenten Stäm-  
men in Gegenwart von Edein (hierbei sollte die Wirkung der  
Mutation zur Edeinresistenz unter dem Einfluß von Edein be-  
obachtet werden). Anschließend sollten die aus den verschie-  
denen Kreuzungen erhaltenen intergenen und interallelen Re-  
kombinanten untersucht werden, um Aufschlüsse über den  
eventuellen Einfluß von Edein bzw. der Mutation zur Edein-  
resistenz oder von beiden Faktoren gemeinsam auf das Rekombi-  
nationsgeschehen zu erhalten. Unter der Annahme, daß ver-  
schiedene molekulare Mechanismen für Crossover und Gen-Kon-  
version verantwortlich sind, wäre zu erwarten, daß Edein

bzw. die Mutation zur Edeinresistenz diese Rekombinationsereignisse in unterschiedlicher Weise beeinflussen.

Im dritten Teil der vorliegenden Arbeit wurde schließlich geprüft, ob Edein bzw. die Mutation zur Edeinresistenz in ähnlicher oder verschiedener Weise wirken, wobei als Kriterium die Beeinflussung der Nukleaseaktivität, der Enzyme der Dunkel-Reparatur, sowie der Zellgröße und Kernzahl dienten. Es wurde hier insbesondere auch die Frage nach einem möglichen Zusammenhang zwischen den Mechanismen der Dunkel-Reparatur und der genetischen Rekombination gestellt. Eine Beeinflussung nicht nur der Rekombination sondern auch der Dunkel-Reparatur durch Edein bzw. die Mutation zur Edeinresistenz würde für einen solchen Zusammenhang sprechen.

## B. MATERIAL UND METHODEN

### 1. Stämme:

*Neurospora crassa*, Wildtypen 74-OR 23-1A De Serres und 74-OR 8-1a. Mutanten F10-ad-4,A; Y152M3 hist-7,A; 33757 leu-1,A; Herkunft: Fungal genetics stock center, Arcata, California 95521, USA. Mutanten B<sub>3</sub>, Y30539, 75001 pan-2, ylo-1, tryp-2,A; B<sub>5</sub>, 3254 pan-2, ad-1,a; Herkunft: Dr. Threlkeld, Department of Biology, Mac Master University, Hamilton, Ontario, Canada.

### 2. Nährboden und Puffer:

#### 2.1. Vogels Minimalmedium (50-fach):

In 750 ml H<sub>2</sub>O werden gelöst: 150 g Na<sub>3</sub>-Citrat. 5,5 H<sub>2</sub>O, 250 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 10 g MgSO<sub>4</sub>. 7 H<sub>2</sub>O, 5 g CaCl<sub>2</sub>. 2 H<sub>2</sub>O, Spurenelemente und Biotin (nach Vogel, 1956).

#### 2.2. Vollmedium:

20 ml Vogels Minimal (vgl. 2.1.), 980 ml H<sub>2</sub>O, 10 ml. Glycerin, 2,5 g. Yeast Extract, 1 g Kasein Hydrolysat, 10 ml Vitaminlösung und 1,5 % Difco-Bacto-Agar.

#### 2.3. GFS-Vollmedium:

Wie 2.2. plus 1 % Sorbose, 0,05 % Fructose und 0,05 % Glucose anstelle von Glycerin.

#### 2.4. GFS-Minimalmedium:

20 ml Vogels Minimal (vgl. 2.1.), 980 ml H<sub>2</sub>O, 1 % Sorbose, 0,05 % Fructose, 0,05 % Glucose und 1,5 % Difco-Bacto-Agar. Nach Bedarf supplementiert mit 100 µg

je Aminosäure pro ml, 2  $\mu$ g Panthothensäure pro ml und 200  $\mu$ g Edein pro ml.

2.5. Minimalmedium:

20 ml Vogels Minimal (vgl. 2.1.), 980 ml H<sub>2</sub>O, 1,5 % Sucrose, als flüssiges Test-Medium für auxotrophe Mutanten und mit Zusatz von 1,5 % Agar als festes Anzuchtsmedium für Heterokaryen.

2.6. Neurospora Culture Agar (N.C.A.):

1 l H<sub>2</sub>O plus 65 g Difco-Bacto-Neurospora Culture Agar

2.7. Westergaard-Kreuzungsmedium:

Westergaard-Kreuzungsmedium enthält 1 l H<sub>2</sub>O: 1 g KNO<sub>3</sub>, 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O, 0,1 g NaCl, 0,1 g CaCl<sub>2</sub>, 1 ml Spurenelementlösung, 1 ml Biotinlösung, 10 g Glucose und bei festem Medium 15 g Difco-Bacto-Agar (nach Westergaard und Mitchell, 1947). Nach Bedarf supplementiert mit 100  $\mu$ g je Aminosäure, 2  $\mu$ g Pantothensäure und 200  $\mu$ g Edein pro ml.

2.8. RNS-Medium:

In 1 l H<sub>2</sub>O werden gelöst: 5 g NH<sub>4</sub>-Tartrat, 1 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 1 g KCl, 0,5 g MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O, 0,1 g NaCl, 0,14 g CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, 100  $\mu$ g Hefe RNS (Boehringer, Mannheim), 5 g Sucrose, Spurenelemente und Biotin.

2.9. Tris-Maleinsäure Puffer:

24,2 Tris + 23,2 g Maleinsäure pro 1 Wasser: 50 ml dieser Lösung + 26 ml NaOH 0,2 N + Wasser bis 200 ml, eingestellt auf pH=6, 0,076 M.

2.10. Tris-EDTA Puffer:

0,1 M Tris + 0,001 M EDTA, eingestellt auf pH=8.

3. Besondere Chemikalien:

3.1. Edein: Edeine complex, Pharmaceutical Works, Polfa, Tarchomin, Polen.

Sofern nicht anders angegeben, wurde eine Endkonzentration von 200  $\mu\text{g/ml}$  benutzt, es ist die Konzentration, ab welcher der Wildtyp auf festem Nährboden nicht mehr wächst. Das Edein wurde auf einer mit Alkohol abgeflammt Aluminiumfolie (Edein ist hygroskopisch) steril abgewogen und mit einer sterilen Pinzette in steriles, geschmolzenes und auf 47° C temperiertes Medium vor dessen Erstarren eingebracht.

3.2. 1 - Methyl-3-Nitro-1-Nitrosoguanidin (NTG): EGA-Chemie KG, Keppler + Reif, 7924 Steinheim/Albuch.

Stammlösungen mit 3 mg NTG pro ml Tris-Maleinsäure Puffer (vgl. 2.9.) wurden filtersterilisiert und bei 4° C aufbewahrt.

3.3. Natriumhypochloritlösung, technisch (etwa 13 % aktives Chlor): Merck, Darmstadt.

3.4. Scintillationsflüssigkeit:

In 1 l Toluol werden gelöst: 5 g 2,5 Diphenyloxazol (PPO) und 0,3 g 2,2'-p-Phenylene-bis (5-Phenyloxazol) (POPOP).

3.5. Zirkuläre Plasmid DNS:

Hochgereinigte  $\lambda\text{dv}$  DNS in der überspiralisierten Form mit einer Aktivität von ca. 3000 ipm  $^3\text{H}/\mu\text{g}$ ;

4,5 OD wurde von Doz. G. Hobom, Freiburg, zur Verfügung gestellt.

3.6. Orcein:

Merck, Darmstadt.

4. Anzuchtverfahren zur Gewinnung von Konidien:

Erlenmeyer-Weithalskolben (300 ml, Schaumstoffkappenverschluß) mit je 50 ml Vollmedium wurden mit Konidien inokuliert und bei 25° C 7 Tage bebrütet (Standardkulturen).

5. Herstellen von Konidiensuspensionen:

Konidien 7 Tage alter Standardkulturen wurden als Stab trocken geerntet, in Tris-Maleinsäure suspendiert und zur Entfernung von Myzel durch sterile Watte filtriert. Die Bestimmung der Konidiendichte erfolgte im Hämocytometer oder im Coulter Counter. Es wurden jeweils zwei frische Füllungen ausgezählt. Die Suspensionen wurden auf  $1 \times 10^7$  Konidien/ml eingestellt.

6. Plattieren von Konidien:

Erlenmeyer-Kolben (200 ml) mit 100 ml geschmolzenem GFS-Vollmedium wurden nach Abkühlen auf 47° C mit ca. 500 Konidien beschickt. Nach gutem Durchmischen der Konidien mit dem Medium wurden die 100 ml gleichmäßig auf Petrischalen verteilt.

7. Induktion edeinresistenter Mutanten mit NTG:

In eine Flasche (100 ml) wurden 10 ml Suspension (vgl. 5), 0,5 ml Stammlösung NTG (vgl. 3.2.) und 1,5 ml Tris-Maleinsäure gegeben und im Wasserbad bei 25° C, 15 min. belüftet. Die Suspension wurde danach durch ein Sterilisationsfilter abfiltriert, mit Puffer gewaschen und in 10 ml Puffer resuspendiert. Nach geeigneter Verdünnung in Puffer wurde zur Ermittlung der Überlebensrate auf GFS-Minimalmedium ohne Edein und zur Selektion von edeinresistenten Mutanten auf GFS-Minimalmedium mit 200 µg Edein/ml plattiert. Minimalmedium wurde benutzt, um etwa entstehende Auxotropie von vornherein auszuschließen.

Die auf Platten mit 200 µg Edein/ml gewachsenen Konidien wurden auf N.C.A. abisoliert und durch einen qualitativen Edeinresistenz-Test geprüft (vgl. 8.1.).

8. Edeinresistenz-Test:

8.1. Qualitativ:

Konidien-Rohsuspensionen der zu prüfenden Isolate wurden auf Petrischalen mit edeinhaltigem GFS-Minimalmedium ausgestrichen. 7 verschiedene Suspensionen plus Wildtypsuspension als Kontrolle wurden pro Platte geprüft. Die Petrischalen wurden 3 - 6 Tage bei 25° C bebrütet und schließlich visuell ausgewertet (s. Abb. 2).

## 8.2. Quantitativ:

Die Konidiensuspensionen der zu prüfenden Isolate wurden in geeigneter Verdünnung auf GFS-Vollmedium ohne bzw. mit 200  $\mu$ g Edein/ml plattiert. Die Anzahl der nach Bebrütung entstehenden Kolonien auf edeinhaltigem Medium relativ zu jener auf edeinfreiem Medium wird hier als "Resistenzgrad" bezeichnet.

## 9. Ermittlung der Auxotrophien:

Sie erfolgte durch Abimpfen von Konidien in Minimalmedium bzw. in Minimalmedium mit geeigneter Supplementierung.



Abb. 2. Qualitativtest auf Edeinresistenz. 5 resistente Isolate und 3 sensible Isolate wurden auf die Agarschicht aufgestrichen und 3 Tage bebrütet. GFS-Minimalmedium + 200  $\mu$ g Edein/ml.

## 10. Kreuzungen:

Sie wurden in Kolben, Röhrchen oder Petrischalen mit festem Westergaard-Kreuzungsmedium (vgl. 2.7.) angesetzt und bis zum Reifen der Perithezien bei 25° C bebrütet (insgesamt ca. 2 - 6 Wochen).

### 10.1. Einzelstranganalyse (random spore analysis):

Es wurde dem bei Neuhäuser, Klingmüller und Kaude-witz (1970) beschriebenen Verfahren gefolgt.

#### a) Isolation von Einzelsporen:

Hierbei wurden die Sporen unter dem Binokular mit einer sterilen Nadel einzeln auf Agarblöckchen aufgebracht. Natriumhypochloritlösung dient dabei zur Abtötung von Konidien. Die Blöckchen wurden anschließend in Schrägröhrchen mit N.C.A. übertragen und danach 2 - 3 Wochen bei 25° C bebrütet. Röhrchen, in denen Wachstum stattgefunden hatte (verursacht durch Konidien, die nach Behandlung mit einer Natriumhypochlorit überlebten), wurden entfernt, die anderen nach einer Schockbehandlung von 30 min. in einem 60° C heißem Wasserbad 7 Tage bei 25° C bebrütet.

#### b) Differentielle Plattierung:

Mit einer sterilen Impfüse wurden von einem Kreuzungskolben ca.  $10^6$  Ascosporen abgenommen und in ein Reagenzglas mit 10 - 11 ml H<sub>2</sub>O gebracht. Die Titerbestimmung erfolgte unter dem Binokular. Nach geeigneter Verdünnung und nach einer Schockbehandlung von 30 min. in einem 60° C heißem Wasserbad wurden die

Sporen in 100 ml geschmolzenes und in geeigneter Weise supplementiertes GFS-Minimalmedium eingebracht und auf 5 Platten verteilt.

#### 10.2. Tetradenanalyse:

Sie wurde an ungeordneten Oktetten, wie bei Hammerl und Klingmüller (1972) beschrieben, vorgenommen. Pro Petrischale wurden 40 ml steriler 4 %iger Agar eingegossen. Aus dem erstarrten Medium wurde mit einer ausgeglühten Lanzettnadel ein ca. 5 mm breiter Rand abgeschnitten, der auf einen Petrischalendeckel gebracht wurde. Dieser Petrischalendeckel wurde über die reifen Kreuzungen gestülpt. Die von den Perithezien ausgeschleuderten Ascosporen bleiben auf der Agaroberfläche kleben und bilden mehr oder weniger dicht gepackte und gestreute Pakete von 8 Sporen. Bevor die Agarschicht zu dicht von Oktetten übersät wird, muß der Deckel erneuert werden. Abhängig von der jeweiligen Kreuzung und deren physiologischen Bedingungen erstreckte sich die Zeitspanne der Exposition von 10 Sekunden bis zu einigen Minuten. Danach wurden die Sporen von verschiedenen Oktetten abisoliert (vgl. 10.1.). Die Isolierung erfolgte unter dem Binokular. Nur die Oktette, von denen mindestens 6 Sporen gewachsen waren, wurden weiter zur Analyse benutzt. Alle Sporen von vollständigen oder unvollständigen Oktetten wurden dann auf ihre Edeinresistenz geprüft (vgl. 8.1.).

11. Prüfung des Paarungstyps:

In Röhrchen mit Westergaard-Kreuzungsmedium wurden Isolate, die aus den unter 10.1. erwähnten Kreuzungen stammten, einmal mit Wildtyp A und einmal mit Wildtyp a inokuliert. Aus der Entstehung von Perithezien wurde auf den jeweiligen Paarungstyp geschlossen.

12. Herstellen von Heterokaryen:

Konidien von je 2 verschiedenen auxotrophen Mutanten, von denen eine zusätzlich das Merkmal Edeinresistenz trug, wurde im Verhältnis 1 : 1 gemischt, in Kolben mit Minimalmedium zu Myzel herangezüchtet und die an solchem Myzel entstehenden Konidien als Suspension in geeigneter Verdünnung auf GFS-Vollmedium (Bestimmung der Überlebensrate), GFS-Minimalmedium (Wachstum aller heterokaryotischen Zellen) und auf GFS-Minimalmedium mit 200  $\mu$ g Edein/ml (Wachstum heterokaryotischer Zellen, die zusätzlich edeinresistent sind) ausplattiert. Unter Überlebensrate sei hier und im Folgenden die Anzahl gebildeter Kolonien relativ zur Anzahl plattierter Zellen verstanden.

13. Prüfung des Genotyps gegenüber dem Phänotyp:

Konidiensuspensionen wurden in geeigneter Verdünnung auf GFS-Vollmedium ohne bzw. mit 200  $\mu$ g Edein/ml plattiert. 100 Kolonien von den Platten ohne Edein

und 100 Kolonien von den Platten mit Edein wurden auf N.C.A. abisoliert. Anschließend wurden diese Isolate auf ihre Edeinresistenz qualitativ geprüft. Je 10 Isolate der beiden Serien von 100 Isolaten wurden auch quantitativ geprüft (s. Abb. 3 und Tabelle 8).

14. Nukleaseaktivitätsbestimmung:

Sie erfolgte entweder "in vivo" an Hand des Trockengewichtes, das Myzelium auf RNS-haltigem Medium ergab (vgl. 14.1.), oder "in vitro" durch Messung des Abbaues zirkulärer DNS (vgl. 14.2.).

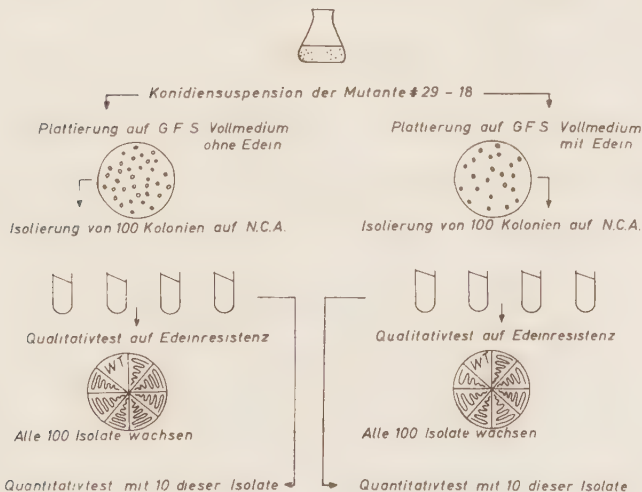


Abb. 3. Schema der Analyse der Variabilität des Phänotyps

Tabelle 8 zu Abb. 3

|    | 1                           | 21 | 28 | 36 | 38 | 46 | 53 | 59 | 70 | 71         | Isolate # | 44                          | 56 | 68 | 61 | 78 | 81 | 91 | 92 | 98 | 100 |  |
|----|-----------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|------------|-----------|-----------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|--|
| 66 | 50                          | 80 | 67 | 73 | 66 | 60 | 58 | 86 | 55 | ohne Edein | 63        | 72                          | 75 | 56 | 55 | 60 | 63 | 64 | 74 | 74 | 50  |  |
|    | Mittelwert 66,1 % $\pm$ 3,5 |    |    |    |    |    |    |    |    |            |           | Mittelwert 63,2 % $\pm$ 2,7 |    |    |    |    |    |    |    |    |     |  |
| 40 | 34                          | 27 | 26 | 22 | 26 | 20 | 35 | 24 | 19 | mit Edein  | 24        | 27                          | 23 | 28 | 32 | 23 | 23 | 32 | 37 | 30 |     |  |
|    | Mittelwert 27,3 % $\pm$ 1,8 |    |    |    |    |    |    |    |    |            |           | Mittelwert 27,9 % $\pm$ 1,5 |    |    |    |    |    |    |    |    |     |  |

Ergebnisse von Quantitativtests mit Mutante #29 - 18. Ohne Edein wurden jeweils ungefähr 200 Zellen, mit Edein ungefähr 300 Zellen plattiert. Angegeben ist die Anzahl der erhaltenen Kolonien in % der plattierten Zellen.

#### 14.1. Trockengewichtsbestimmung:

Kolben mit flüssigem RNS-Medium (vgl. 2.8.) ohne bzw. mit Edein (150  $\mu\text{g/ml}$  für den Wildtyp und 200  $\mu\text{g/ml}$  für die Mutanten) wurden mit je  $10^6$  Konidien des Wildtyps bzw. edeinresistenter Mutanten beschickt und bei  $25^\circ\text{C}$  geschüttelt. Nach 20 bis 92 Stunden wurden die entstandenen Myzelien geerntet, zwischen Filterpapier ausgedrückt und im Brutschrank 24 Stunden bei  $80^\circ\text{C}$  getrocknet. Danach wurden sie gewogen.

#### 14.2. Messungen des Abbaues zirkulärer DNS:

16 Stunden alte Myzelien vom Wildtyp bzw. von edeinresistenten Mutanten wurden abgenutscht und das Naßgewicht bestimmt. Die Myzelien wurden anschließend in einem Starmix zerkleinert und durch Schütteln in Glasflaschen mit Glasperlen aufgeschlossen. Als Aufschlußpuffer diente einmal Tris pH=8, ein anderes Mal Tris + EDTA pH=8. Jedes Homogenisat wurde danach im Ti-60-Rotor bei 45000 rpm ( $150000 \times g$ ) 60 min. lang zentrifugiert, um eine Grobreinigung zu erreichen. Der Proteingehalt des Überstandes wurde nach Lowry (1951) bestimmt und durch Zugabe von Puffer auf 2,45 mg/ml eingestellt. 0,2 ml dieses Extraktes wurden 0 min., 120 min. oder 240 min. in Cellulose-Nitrat Zentrifugenröhrchen bei  $25^\circ\text{C}$  mit 20 ml radioaktiver  $\lambda\text{dv}$  DNS inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 ml  $\text{CsCl}$  (1 g/ml) + 0,45 ml Ethidiumbromid (8 mg/ml) gestoppt. Die Zentrifugenröhrchen wurden mit

Paraffinöl aufgefüllt, mit Aluminiumdeckeln luftdicht verschlossen und im Ti-50-Rotor 40 Stunden bei 38000 rpm ( $100000 \times g$ ) und  $5^{\circ} \text{C}$  zentrifugiert. Anschließend wurden die Gradienten durch Austropfen auf GFC-Filter in Fraktionen zu je 5 Tropfen zerlegt. Die Filter wurden 30 min. mit 10 % TCA behandelt und je 10 min. mit 1 % TCA bzw. Alkohol gewaschen. Nach Trocknen der Filter im Brutschrank ( $1 \text{ St}/60^{\circ} \text{C}$ ) wurden sie in Gläschen mit 10 ml Scintillationsflüssigkeit überführt. Die Radioaktivität auf den Filtern wurde im Flüssigkeitsscintillationszähler bestimmt.

15. Messungen zur UV-Inaktivierung, Photoreaktivierung und Dunkel-Reparatur:

Als UV-Quelle wurde eine Quecksilberlampe verwendet. Fabrikat: Original Hanau, maximale Emission bei einer Wellenlänge von  $254 \text{ nm}$ .

Je 20 ml Konidiensuspension mit dem Titer  $1 \times 10^7$  Konidien/ml wurden in einer offenen Petrischale 10 min. aus 50 cm Entfernung bestrahlt. Eine elektrische Schüttelvorrichtung sorgte für die Durchmischung der Konidien während der Bestrahlung. Es wurden nach 0 min. und nach 2 min. Bestrahlung 0,5 ml und danach in 2 min.-Abständen bis 10 min. 1 ml Proben entnommen, die sofort 1 : 10 verdünnt und nach weiteren Verdünnungsschritten auf GFS-Vollmedium mit bzw. ohne Edein plattiert wurden. Um Photoreaktivierung während der Bestrahlung selbst zu vermeiden (Terry,

Kilbey und Howe, 1967), wurde hier bei Gelblicht gearbeitet. Anschließend wurde die eine Hälfte der Platten in Dunkelheit bei 25° C 3 Tage bebrütet, die andere Hälfte zunächst 24 Stunden unter Fluoreszenzlicht (Osram-L, 40 Lux/cm<sup>2</sup>, Abstand 30 cm) (Photo-reaktivierung), und danach 2 Tage in Gelblicht bei 25° C weiter bebrütet.

16. Bestimmung des Zellvolumens:

Das Volumen nichtleitender, in einem Elektrolyt suspendierter Partikel kann nach einem von der Fa. Coulter angegebenen Meßverfahren bestimmt werden.

Dieses Verfahren wurde von Kachel (1971) technisch verbessert. Zellen, deren Volumen bestimmt werden soll, werden als Suspension in eine Meßkammer eingespritzt, die gegen Einflüsse von außen durch einen Faraday'schen Käfig abgeschirmt ist. Durch den Unterdruck, der an der Meßkammer anliegt, werden die Zellen über eine Zuführungsspitze durch ein stromdurchflossenes Meßloch gesaugt. Im Meßloch selbst kommt es dabei zu einer Änderung des elektrischen Impulses, die verstärkt und über einen angeschlossenen Computer klassiert wird. Die Höhe der Impulse ist ein Maß für das Zellvolumen. Zu Einzelheiten vgl. Angerbauer (1972). Nach diesem Verfahren wurden in der vorliegenden Arbeit die Volumenverteilungskurven von Wildtypkonidien, die auf Medium ohne bzw. mit 150 µg Edein/ml gezüchtet wurden,

und von Konidien der edeinresistenten Mutante #29, die auf Medium ohne bzw. mit 200  $\mu$ g Edein/ml gezüchtet wurden, aufgenommen. Die Suspensionen (vgl. B.5) waren zuvor abzentrifugiert und in einem physiologischen Elektrolyt (0,95 % Na-Salzlösung) resuspendiert worden.

17. Kernfärbung:

Es wurde dem bei Somers, Wagner und Hsu (1960) beschriebenen Verfahren gefolgt.

Suspensionen von Wildtypkonidien, die auf Medium ohne bzw. mit 150  $\mu$ g Edein/ml, und von Konidien der edeinresistenten Mutante #29, die auf Medium ohne bzw. mit 200  $\mu$ g Edein/ml gezüchtet worden waren, wurden abzentrifugiert und in Essigsäure-Alkohol (1 : 3) für 25 Minuten fixiert. Danach wurden die Konidien in 1 N HCl 8 Minuten bei 60° C hydrolysiert (das Cytoplasma von nicht hydrolysierten Konidien wird mit Orcein zu stark gefärbt).

Die Kernfärbung erfolgte durch direkte Zugabe einiger Tropfen von 2 % Orcein in 50 %iger Essigsäure auf die hydrolysierten Konidien. Die Auswertung wurde mit einem Olympus-Mikroskop im Phasen-Kontrast vorgenommen.

18. Statistische Sicherung:

Bei den angegebenen Mutungsgrenzen handelt es sich, soweit nicht anders vermerkt, um den einfachen mittleren Fehler des Mittelwertes.

## C. ERGEBNISSE

### I. Herstellung edeinresistenter Mutanten sowie ihre genetische Analyse

#### I.1. Gewinnung von stabilen edeinresistenten Mutanten

Eine Wildtyp-Konidiensuspension (vgl. B.5) wurde mit NTG (vgl. B.7) behandelt und  $4,5 \times 10^7$  Zellen auf GFS-Minimalmedium mit 200  $\mu\text{g}$  Edein/ml ausplattiert (vgl. B.2.4). Dabei wurden 101 Isolate erhalten, die trotz Gegenwart von Edein zu wachsen vermochten. 64 dieser Isolate wurden auf N.C.A. abisoliert (vgl. B.2.6). Sie seien im folgenden als Primärisolate bezeichnet. Die Primärisolate wurden über 12 vegetative Generationen qualitativ auf ihre Resistenz hin geprüft (vgl. B.8.1). Nur 3 von ihnen, und zwar die Isolate #18, 29 und 47<sup>+</sup>) behielten über diesen Zeitraum hin ihre Resistenz (s. Tabelle 1).

5 Primärisolate wurden auch quantitativ auf ihren Resistenzgrad hin geprüft (vgl. B.8.3). Die Ergebnisse in Tabelle 2 zeigen, daß der Resistenzgrad im Vergleich zur Anzahl der plattierten Zellen ziemlich niedrig war. Die Resistenz blieb bei den Isolaten #18 und #47 mindestens bis zur 9. Generation erhalten, wobei das letztere Isolat große Schwankungen bezüglich des Resistenzgrades in den verschiedenen Generationen zeigte. Bei den Isolaten #19, 29 und 33 nahm der Resistenzgrad über mehrere Generationen hin mit

---

<sup>+</sup>) Fußnote: Das Symbol # steht hier und im folgenden für "Nummer".

Tabelle 1

---

| Anzahl der Generationen        | Anzahl der resistenten Isolate in diesen Generationen |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------|
| <hr/>                          |                                                       |
| 0                              | 64                                                    |
| 1                              | 36                                                    |
| 2                              | 23                                                    |
| 3                              | 12                                                    |
| 4                              | 5                                                     |
| 5 und die übrigen <sup>+</sup> | 3 ( #18, -29, -47)                                    |

---

<sup>+</sup> Geprüft bis zur 12. Generation

---

Stabilität der Edeinresistenz in 64 Primärisolaten bei vegetativer Vermehrung (Qualitativtest)

---

unterschiedlicher Geschwindigkeit ab.

Für weitere Analysen war es notwendig, reine Linien von den Mutanten zu erstellen. Deshalb wurden 3 Primärisolate der ersten Generation ( #18, 29 und 47) mit dem Wildtyp auf festem Westergaard-Kreuzungsmedium (vgl. B.2.7) rückgekreuzt und die von diesen Kreuzungen abisolierten Ascosporen (vgl. B.10.1.a) jeweils über 12 vegetative Generationen quantitativ auf ihre Resistenz geprüft. Die durch Rückkreuzung erhaltenen Mutanten werden als Sekundärisolate bezeichnet. Auf die Nummer des Primärisolats, aus welchem sie hervorgingen, folgt die Isolationsnummer der Ascospore aus der betreffenden Kreuzung mit dem Wildtyp.

Tabelle 2

| ed <sup>r</sup> Isolat# | Generation |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-------------------------|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                         | 1.         | 2.   | 3.   | 4.   | 5.   | 6.   | 7.   | 8.   | 9.   |
| 18                      | 27,1       | 26,6 | 22,0 | 18,0 | 14,9 | 5,7  | 22,0 | 23,3 | 24,0 |
| 19                      | 4,0        | 3,7  | 2,2  | 2,1  | —    | —    | —    | —    | —    |
| 29                      | 17,5       | 17,0 | 15,0 | 12,0 | 12,0 | 11,0 | 9,5  | 8,0  | 1,0  |
| 33                      | 1,8        | 1,5  | 1,0  | 0,7  | —    | —    | —    | —    | —    |
| 47                      | 16,0       | 5,5  | 3,0  | 0,27 | 39,0 | 1,7  | 23,0 | 3,0  | 37,0 |

Stabilität der Edeinresistenz in 5 Primärisolaten bei vegetativer Vermehrung (Quantitativtest). Es ist die Anzahl der mit Edein erhaltenen Kolonien, bezogen auf die Anzahl ohne Edein erhalten und gleich 100 gesetzt, angegeben. Ohne Edein wurden jeweils ungefähr 500 Zellen, mit Edein jeweils ungefähr 50000 Zellen plattiert, was eine statistische Abweichung in der Größenordnung von  $\pm 0,3\%$  (#33) und  $\pm 1\%$  (#18) ergibt.

Tabelle 3

|         | Generation               |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|---------|--------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|         | ed <sup>r</sup> Isolat # | 1.   | 2.   | 3.   | 4.   | 5.   | 6.   | 7.   | 8.   | 9.   | 10.  | 11.  | 12.  |
| 29 - 13 | 23,6                     | 23,1 | 23,9 | 23,0 | 23,6 | 24,0 | 23,8 | 23,8 | 24,0 | 23,1 | 23,5 | 23,0 | 23,0 |
| 29 - 16 | 15,0                     | 15,2 | 15,1 | 14,8 | 15,0 | 15,3 | 14,6 | 14,6 | 14,0 | 14,9 | 15,1 | 14,5 | 14,0 |
| 29 - 18 | 22,3                     | 22,0 | 22,3 | 22,2 | 22,0 | 22,8 | 22,8 | 22,8 | 22,6 | 22,1 | 22,8 | 22,6 | 22,0 |

Stabilität der Edeinresistenz in 3 Sekundärisolaten bei vegetativer Vermehrung (Quantitativtest).

Sonst wie Tabelle 2. Ohne Edein wurden jeweils ungefähr 500 Zellen, mit Edein jeweils ungefähr 2000 Zellen plattiert, was eine statistische Abweichung in der Größenordnung von  $\pm 1\%$  ergibt.

Die zugrunde liegende Mutation sei mit  $ed^r$  symbolisiert.

Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse für die drei edeinresistenten Sekundärisolate # 29 - 13 a, # 29 - 16 A und # 29 - 18 A. Der Resistenzgrad war, im Gegensatz zu den Primärisolaten, bei allen 3 Isolaten konstant. Schwankungen wie bei Primärisolat # 47 wurden nicht beobachtet.

Ähnliche Ergebnisse lieferten Sekundärisolate aus der Kreuzung des Primärisolates # 18 mit dem Wildtyp.

Aus der Kreuzung Primärisolat # 47 mit dem Wildtyp wurden 300 Ascosporen isoliert. Von ihnen waren jedoch nur 5 keimfähig. Alle 5 Isolate erwiesen sich als edeinsensibel. Mit dieser Mutante wurden daher keine weiteren Versuche gemacht.

## I.2. Kartierung der stabilen edeinresistenten Mutanten

Um die erhaltenen stabilen edeinresistenten Mutanten zu kartieren, wurden mit ihnen weitere Kreuzungen durchgeführt. So wurde das Sekundärisolat # 29 - 18 A mit dem edeinsensiblen Wildtyp auf festem Westergaard-Kreuzungsmedium (vgl. B.2.7) gekreuzt. Von den reifen Perithezien wurden Oktette auf N.C.A. abisoliert (vgl. B.2.5) und - nach Ankeimen der Sporen - 15 Oktette qualitativ auf ihre Resistenz geprüft (vgl. B.8.1). Die Ergebnisse in Tabelle 4 zeigen, daß die Resistenz karyotisch vererbt wird (4 resistente Sporen; 4 sensible Sporen).

Tabelle 4

|                                | Anzahl der<br>Oktette | Anzahl der<br>resistenten<br>Sporen | Anzahl der<br>sensiblen<br>Sporen | Anzahl keim-<br>fähiger Spo-<br>ren je Oktett |
|--------------------------------|-----------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------|
| vollstän-<br>dige<br>Oktette   | 6                     | 4                                   | 4                                 | 8                                             |
| unvoll-<br>ständige<br>Oktette | 4<br>2<br>3           | 4<br>3<br>3                         | 3<br>4<br>3                       | 7<br>7<br>6                                   |

Ergebnisse von Oktett-Analysen bei Kreuzung der Mutante  
# 29 - 18 mit dem Wildtyp

Durch die Kreuzung mit der sensiblen auxotrophen Mutante ad-1, pan-2 konnte ferner gezeigt werden, daß die Mutation # 29 auf Kopplungsgruppe VI lokalisiert ist. Dazu wurden 217 Isolate (von 288 abisolierten Sporen) qualitativ auf ihre Resistenz (vgl. B.8.1) sowie auf ihre Auxotrophie (vgl. B.9) geprüft. Die Verteilung von Elterntypen und Rekombinanten wird in der Tabelle 5 gezeigt. Man kann den Daten entnehmen, daß der Mutationsort  $ed^F$  - 29 in Kopplungsgruppe VI ca. 19,4 Rekombinationseinheiten (12,9 + 6,5) links von der Marke ad-1 liegt. In dieser Kreuzung traten edeinresistente Sporen häufiger auf als edeinsensible. Dies galt sowohl für die Elterntypen als auch für die Rekombinanten, was für eine bessere Keimungsrate

Tabelle 5

| Genotyp                                              | Gefundene Sporen dieses Genotyps | %    | Klasse                        |
|------------------------------------------------------|----------------------------------|------|-------------------------------|
| ed <sup>r</sup> , ad <sup>+</sup> , pan <sup>+</sup> | 95                               | 43,7 | Elterntypen                   |
| ed <sup>s</sup> , ad <sup>-</sup> , pan <sup>-</sup> | 63                               | 29,0 |                               |
| ed <sup>r</sup> , ad <sup>-</sup> , pan <sup>-</sup> | 28                               | 12,9 | Crossover zwischen ed und ad  |
| ed <sup>s</sup> , ad <sup>+</sup> , pan <sup>+</sup> | 14                               | 6,5  |                               |
| ed <sup>r</sup> , ad <sup>+</sup> , pan <sup>-</sup> | 15                               | 6,9  | Crossover zwischen ad und pan |
| ed <sup>s</sup> , ad <sup>-</sup> , pan <sup>+</sup> | 2                                | 1    |                               |
| ed <sup>r</sup> , ad <sup>-</sup> , pan <sup>+</sup> | 0                                | —    | Doppeltes                     |
| ed <sup>s</sup> , ad <sup>+</sup> , pan <sup>-</sup> | 0                                | —    | Crossover                     |

Ergebnisse der Kreuzung Mutante # 29 - 18, A x ed<sup>s</sup>, ad-1, pan-2, a

edeinresistenter Sporen spricht.

Eine Interpretation dieses Befundes wird in der Diskussion gegeben.

In derselben Weise wurde das Sekundärisolat # 18 mit dem oben genannten sensiblen auxotrophen ad-1, pan-2 Stamm auf festem Westergaard-Kreuzungsmedium (vgl. B.2.7) gekreuzt. 125 Ascosporen aus solchen Kreuzungen wurden abisoliert und qualitativ auf ihre Resistenz (vgl. B.8.1) sowie auf

ihre Auxotrophie (vgl. B.9) geprüft. 68 Isolate erwiesen sich als resistent und prototroph, die restlichen 57 als sensibel und auxotroph. Es erfolgte also keine Rekombination, was für eine enge Kopplung des Mutationsortes  $ed^r-18$  mit den Genen  $ad-1$  und  $pan-2$  (Kopplungsgruppe VI) spricht. Es darf angenommen werden, daß der Mutationsort zwischen beiden Genen liegt.

Um zu prüfen, ob in solchen Kreuzungen eine Rekombination überhaupt möglich ist, wurde der Paarungstyp bei 66 von diesen Isolaten (32 sensibel und 34 resistent) ermittelt. Die Paarungstypmarke A/a liegt in der Kopplungsgruppe I. Die in Tabelle 6 zusammengestellten Ergebnisse dazu zeigen, daß die Paarungstypen A und a gleichmäßig auf sensible und resistente Isolate verteilt auftraten, das heißt, eine Rekombination mit Marken auf anderen Kopplungsgruppen ist möglich.

Tabelle 6

| Anzahl der Isolate mit unten angegebenem Paarungstyp |    |    |
|------------------------------------------------------|----|----|
|                                                      | a  | A  |
| 32 $ed^s$                                            | 15 | 17 |
| 34 $ed^r$                                            | 17 | 17 |

Bestimmung des Paarungstyps an 66 Isolaten aus der Kreuzung Sekundärisolat #18 - 40, A x  $ad-1$ ,  $pan-2$ , a. Jedes Isolat wurde durch Kreuzung mit Wildtyp A und Wildtyp a getestet.

Ein entsprechendes Ergebnis wurde bei Kreuzung des Sekundärisolats # 18 mit einem sensiblen,  $ad-4$  auxotrophen Stamm (Kopplungsgruppe 111) erhalten, da sich von 109 abisolierten Ascosporen 46 als Rekombinanten erwiesen. Da der Mutationsort  $ed^R-29$  ca. 20 Rekombinations-Einheiten vom Mutationsort  $ed^R-18$  entfernt liegt, kennzeichnen beide zwei verschiedene, in mutiertem Zustand Edeinresistenz bedingende Gene. Die zugehörigen Gen-Loci werden im folgenden als  $ed^R-1$  (Isolat # 18) und  $ed^R-2$  (Isolat # 29) bezeichnet, die beiden Isolate # 18 und # 29 selbst als Mutanten.

### I.3. Heterokaryon-Teste

Die beiden Mutanten # 18 bzw. # 29 wurden danach weiter durch Heterokaryon-Teste charakterisiert. Durch solche Teste sollte ermittelt werden, ob das jeweilige resistente Allel gegenüber dem sensiblen Wildtypallel dominant oder rezessiv ist (vgl. B.12).

Die Ergebnisse in Tabelle 7 zeigen, daß bei beiden Mutanten der heterokaryotische Teil einer plattierten Konidienpopulation in Gegenwart von Edein nicht wächst. Die Edeinresistenz ist also gegenüber dem sensiblen Wildtypallel rezessiv. Bei dem zweiten geprüften Heterokaryon (Mutante # 18) wurden zusätzlich Aliquots der benutzten Konidiensuspension auf teilsupplementiertem GFS-Minimalmedium (vgl. B.2.4) ausplattiert, um Aufschluß über die Kernverhältnisse in den Zellen zu erhalten. Man kann der

Tabelle 7

|                                                        | plattierte<br>Zellen | gefundene<br>Kolonien | Überlebens-<br>rate % |
|--------------------------------------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| <hr/>                                                  |                      |                       |                       |
| # 29, pan-2-tryp-2, A<br>(Isolat 103)+ad-4, A          |                      |                       |                       |
| Vollm.                                                 | 540                  | 420                   | 77,7                  |
| Minimalm.                                              | 1080                 | 300                   | 27,7                  |
| Minimalm. + 200 $\mu$ g ed/ml                          | 5400                 | 0                     |                       |
| Minimalm. + 200 $\mu$ g ed/ml                          | 54000                | 0                     |                       |
| <hr/>                                                  |                      |                       |                       |
| # 29, pan-2, tryp-2, A<br>(Isolat 213)+ad-4, A         |                      |                       |                       |
| Vollm.                                                 | 519                  | 405                   | 78,0                  |
| Minimalm.                                              | 1038                 | 380                   | 36,6                  |
| Minimalm. + 200 $\mu$ g ed/ml                          | 5190                 | 0                     |                       |
| Minimalm. + 200 $\mu$ g ed/ml                          | 51900                | 0                     |                       |
| <hr/>                                                  |                      |                       |                       |
| # 18, ad-4, A<br>(Isolat 7)+ hist-7, A                 |                      |                       |                       |
| Minimalm. + 100 $\mu$ g ad/ml<br>+ 100 $\mu$ g hist/ml | 489                  | 360                   | 73,6                  |
| Minimalm.                                              | 978                  | 183                   | 18,7                  |
| Minimalm. + 100 $\mu$ g ad/ml                          | 733                  | 174                   | 23,7                  |
| Minimalm. + 100 $\mu$ g hist/ml                        | 733                  | 384                   | 52,3                  |
| Minimalm. + 200 $\mu$ g ed/ml                          | 4890                 | 0                     |                       |
| Minimalm. + 200 $\mu$ g ed/ml                          | 48900                | 0                     |                       |
| <hr/>                                                  |                      |                       |                       |
| # 18, ad-4, A<br>(Isolat 30)+ hist-7, A                |                      |                       |                       |
| Minim. + 100 $\mu$ g ad/ml<br>+ 100 $\mu$ g hist/ml    | 575                  | 403                   | 70,0                  |
| Minimalm.                                              | 1150                 | 235                   | 20,4                  |
| Minimalm. + 100 $\mu$ g ad/ml                          | 863                  | 260                   | 30,1                  |
| Minimalm. + 100 $\mu$ g hist/ml                        | 863                  | 474                   | 54,9                  |
| Minimalm. + 200 $\mu$ g ed/ml                          | 5750                 | 0                     |                       |
| Minimalm. + 200 $\mu$ g ed/ml                          | 57500                | 0                     |                       |
| <hr/>                                                  |                      |                       |                       |

Ergebnisse aus Heterokaryon-Testen. Die Dominanz bzw. Resistivität zweier verschiedener ed<sup>r</sup> Mutanten (# 29 und # 18)

wurde analysiert durch Plattierung gleicher Mengen heterokaryotischer Konidienpopulationen entweder auf GFS-Vollmedium oder auf GFS-Minimalmedium, welches die unten angegebenen Supplemente enthielt. Es werden für jede Mutante Ergebnisse mit je 2 verschiedenen Isolaten angeführt.

---

Tabelle 7 dazu weiter entnehmen, daß die edeinsensiblen Kerne in den Konidien etwa doppelt so häufig wie die edeinresistenten Kerne waren.

Die edeinresistenten waren also in der Minderzahl, Dennoch sollte ihr zahlenmäßiger Anteil ausgereicht haben, um im Heterokaryon Wachstum zu ermöglichen, wenn das sensible Allel nicht dominant wäre.

#### I.4. Variabilität des Phänotyps

Die Unstabilität des größten Teiles der erhaltenen Primärisolate und die Tatsache, daß selbst bei den stabilen resistenten Sekundärisolaten jeweils nur ein kleiner Teil der Konidien in Gegenwart von Edein zu wachsen vermag (s. Tab. 3), gab Anlaß zu einer näheren Analyse der Beziehungen zwischen Genotyp und Phänotyp der Edeinresistenz. Dazu wurde das Sekundärisolat # 29 - 18 benutzt.

Als erstes wurde die Frage geprüft, ob alle Zellen einer Konidiensuspension den gleichen Genotyp besitzen. Wie erwähnt, (Tabelle 3), vermögen nur ca. 20 % von ihnen auf Medium mit dem Antibiotikum zu wachsen, während ca. 80 % unter diesen

Bedingungen nicht wachstumsfähig sind. Versuche, die dem Schema der Abb. 3 folgen, zeigen, daß alle nach vegetativer Vermehrung abisolierten Einzelkolonien (entweder von Platten ohne Edein oder von Platten mit dem Antibiotikum) im Qualitativtest wiederum resistent sind. Quantitativeste an solchen Isolaten ergaben die in Tabelle 8 zusammengestellten Zahlenwerte. Es traten keine Unterschiede zwischen den Abkömmlingen von Platten mit oder ohne Edein auf. Die Konidien der Ausgangssuspension waren also genotypisch gleich.

#### I.5. Häufigkeit des resistenten Phänotyps unter verschiedenen Bedingungen

a) Um zu prüfen, ob experimentelle Bedingungen den resistenten Phänotyp beeinflussen können, wurden unterschiedlich alte Konidien der Mutante # 29 auf GFS-Vollmedium (vgl. B.2.3) mit 2 verschiedenen Edeinkonzentrationen (200  $\mu\text{g/ml}$  bzw. 500  $\mu\text{g/ml}$ ) ausplattiert. Die in Abb. 4 wiedergegebenen Ergebnisse zeigen, daß bei 6 - 9 Tage alten Kulturen phänotypisch resistente Zellen am häufigsten auftraten. Konidien von jüngeren oder älteren Kulturen waren nur zu einem kleinen Prozentsatz vom resistenten Phänotyp. Dies galt für beide Edeinkonzentrationen, obwohl die Konzentration von 500  $\mu\text{g}$  Edein/ml immer einen kleineren Prozentsatz als die Konzentration von 200  $\mu\text{g}$  Edein/ml ergab.

b) Bei den vorigen Versuchen wurden Konidien edeinresistenter Isolate, die über einige Generationen in edeinfreiem Medium gewachsen waren, benutzt. Um zu prüfen, ob in Gegenwart von Edein gewachsene Myzelien einen höheren Prozentsatz resistenter Konidien geben, wurden die folgenden Abänderungen gemacht: Zellen der resistenten Mutante # 29 wuchsen in Kolben mit 50 ml Vollmedium (vgl. B.2.2) während 7 Tagen (vgl. B.4) in Gegenwart von Edein. Danach wurden solche Konidien entweder direkt auf Medium mit und ohne Edein plattiert oder in Kolben mit Medium ohne Edein eingepft. Sobald hierin Konidien gebildet wurden (nach 3 Tagen bis zum 15. Tag), wurden Konidien-suspensionen hergestellt (vgl. B.5) und auf GFS-Vollmedium (vgl. B.2.3) ohne bzw. mit Edein ausplattiert. Der Anteil phänotypisch resistenter Zellen verminderte sich dabei um 90 % (von 100 % bis ca. 10 %), das heißt, der relative Anteil phänotypisch resistenter Konidien an der Konidiengesamtpopulation einer Kultur nahm mit zunehmender Dauer der Anzucht dieser Kultur auf edeinfreiem Medium ab (s. Abb. 5).

Dies läßt vermuten, daß auf edeinfreiem Medium ein Selektionsdruck der Entstehung phänotypisch resistenter Konidien entgegenwirkt.

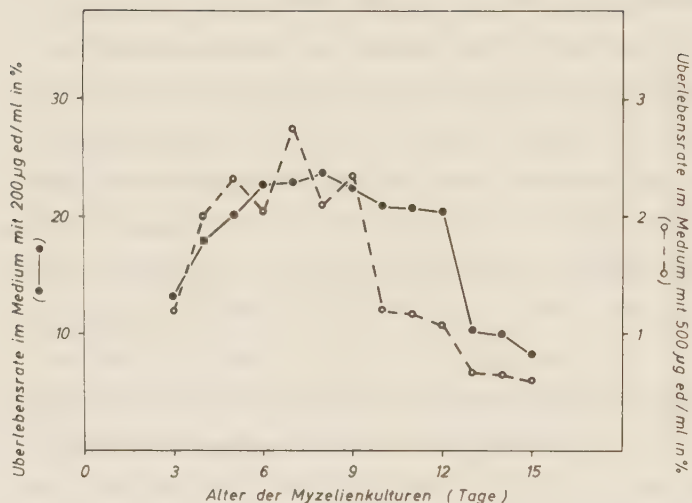


Abb. 4. Überlebensrate von Konidien der Mutante # 29 - 18 aus edeinfreien Myzelienkulturen verschiedenen Alters. Die Konidien wurden auf GFS-Vollmedium entweder ohne oder mit 200 µg bzw. 500 µg Edein/ml plattiert. Die Überlebensrate wird definiert als Anzahl Kolonien, erhalten auf Medium mit Edein, bezogen auf Anzahl Kolonien, erhalten ohne Edein. Letztere wurde = 100 gesetzt.

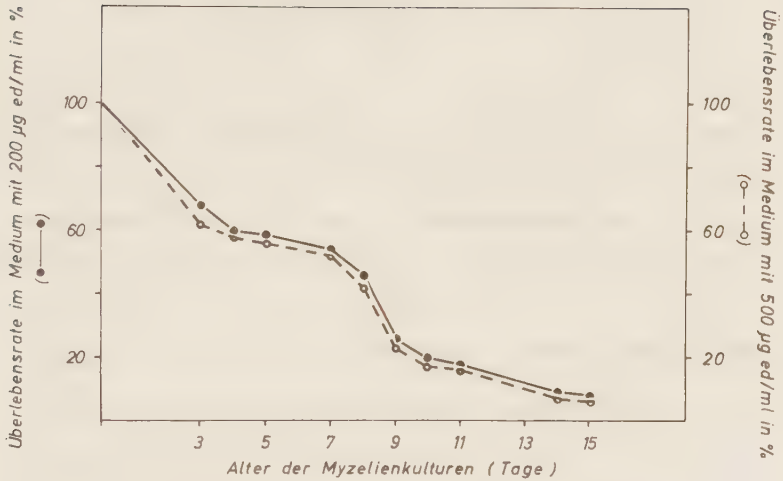


Abb. 5. Überlebensrate von Konidien der Mutante # 29 - 18 aus edeinfreien Myzelienkulturen, die mit Konidien, welche in Gegenwart von Edein gewachsen waren, beimpft wurden. Die Konidien solcher Kulturen wurden 3 bis 15 Tage nach deren Beimpfung geerntet. Anschließend wurden sie auf GFS-Vollmedium entweder ohne oder mit 200 µg bzw. 500 µg Edein/ml plattiert. Die Überlebensrate wurde wie in Abb. 4 berechnet.

## II. Einfluß der Edeinresistenz bzw. des Edeins auf die intergene und interallele Rekombination

### II.1. Intergene bzw. interallele Rekombinationshäufigkeit bei Kreuzungen edeinsensibler Stämme

Für eine Untersuchung der Beeinflussung der Rekombination wurde die Mutante # 29 ( $ed^r-2$ ) ausgewählt. Um Bezugswerte für die Analyse der Wirkung der in ihr vorliegenden Mutation auf die Rekombination zu schaffen, wurden zunächst Kreuzungen zwischen den sensiblen Stämmen  $ed^s$ ,  $ad-1$ ,  $pan-2$  ( $B_5$ ),  $a$  und  $ed^s$ ,  $ylo-1$ ,  $pan-2$  ( $B_3$ ),  $tryp-2, A$  auf festem Westergaard-Kreuzungsmedium (vgl. B.2.7) angesetzt.

Sporen von reifen Perithezien solcher Kreuzungen wurden suspendiert, geschockt und danach auf verschiedenen supplementierte GFS-Minimalmedien ausplattiert (vgl. B.10.1.b). Die Häufigkeit von intergener bzw. interalleler Rekombination wurde an Hand der gefundenen  $ad^+$ ,  $tryp^+$  Prototrophen bzw.  $pan^+$  Prototrophen erfaßt. Im Durchschnitt wurden ca. 6 - 7 %  $ad^+$ ,  $tryp^+$  Prototrophe (intergene Rekombinanten) und ca. 0,4 %  $pan^+$  Prototrophe (interallele Rekombinanten) gefunden (s. Tabelle 9). Dies stimmt mit den Ergebnissen anderer Autoren überein (Case und Giles 1958).

### II.2. Intergene bzw. interallele Rekombinationshäufigkeit bei Kreuzungen edeinresistenter Stämme

Um festzustellen, ob die Mutation # 29 die intergene bzw. interallele Rekombinationshäufigkeit beeinflusst, wurde sie

Tabelle 9

| Kreuzungen                                                                                                                   | Supplement        | Rekombi-<br>nation (%)    | Interpre-<br>tation    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|---------------------------|------------------------|
| ed <sup>S</sup> , ad-1, pan-2 (B <sub>5</sub> ),a<br>x<br>ed <sup>S</sup> , ylo-1, pan-2 (B <sub>3</sub> ),<br>tryp-2, A     | pan<br>ad + trypt | 6,7 ± 0,06<br>0,39 ± 0,04 | intergen<br>interallel |
| ed <sup>R</sup> -2, ad-1, pan-2 (B <sub>5</sub> ),a<br>x<br>ed <sup>R</sup> -2, ylo-1, pan-2 (B <sub>3</sub> ),<br>tryp-2, A | pan<br>ad + trypt | 6,4 ± 0,59<br>0,42 ± 0,02 | intergen<br>interallel |

Intergene und interallele Rekombinationsraten, erhalten in Kreuzungen zwischen zwei edeinsensiblen bzw. edeinresistenten Stämmen. Je ca.  $5 \times 10^4$  und  $5 \times 10^5$  Sporen wurden auf pan bzw. ad + trypt supplementierten Medien ausplattiert. Die Anzahl hier gefundener Kolonien wurde bezogen auf die Anzahl in vollsupplementiertem Medium. Mittelwerte und statistische Schwankungen aus je 3 unabhängig voneinander durchgeführten Kreuzungen.

in die zuvor genannten auxotrophen Stämme eingekreuzt. Die erhaltenen Isolate waren: Stamm 56, ed<sup>R</sup>-2, ad-1, pan-2 (B<sub>5</sub>),a und Stamm 184, ed<sup>R</sup>-2, ylo-1, pan-2 (B<sub>3</sub>), tryp-2, A. Dann wurden, wieder zunächst ohne Edein, Kreu-

zungen zwischen diesen beiden edeinresistenten Stämmen auf festem Westergaard-Kreuzungsmedium (vgl. B.2.7) angesetzt, die Sporen suspendiert, geschockt und auf verschieden supplementierten GFS-Minimalmedien ausplattiert (vgl. B.10.1.b). Die erhaltenen  $ad^+$ ,  $tryp^+$  Prototrophen bzw.  $pan^+$  Prototrophen wurden ausgezählt. Wie bei den Kreuzungen zwischen edeinsensiblen Stämmen wurden ca. 6 - 7 %  $ad^+$ ,  $tryp^+$  Prototrophe und ca. 0,4 %  $pan^+$  Prototrophe erhalten. Daraus kann man schließen, daß die Mutation # 29 ohne Edein weder die intergene noch die interallele Rekombinationshäufigkeit verändert (s. Tabelle 9).

### II.3. Einfluß von Edein auf die Rekombinationshäufigkeit bei edeinsensiblen Stämmen

Um zu prüfen, ob Edein allein die Rekombinationshäufigkeit beeinflussen kann, wurden Kreuzungen zwischen den edeinsensiblen Stämmen  $ed^s$ ,  $ad-1$ ,  $pan-2$  ( $B_5$ ),  $a$  und  $ed^s$ ,  $ylo-1$ ,  $pan-2$  ( $B_3$ ),  $tryp-2$ ,  $A$  auf festem Westergaard-Kreuzungsmedium (vgl. B.2.7) mit 100  $\mu g$  Edein/ml, 150  $\mu g$  Edein/ml und 180  $\mu g$  Edein/ml angesetzt. 180  $\mu g$  Edein/ml werden von den sensiblen Stämmen noch toleriert, allerdings ist hier die Perithezienbildung seltener und die Reifung der Sporen verspätet. Die erhaltenen Sporen wurden suspendiert, geschockt und ausplattiert (vgl. B.10.1.b), die Prototrophen-Kolonien registriert. Die Ergebnisse (s. Abb. 6) zeigen, daß 100  $\mu g$  Edein/ml noch unwirksam waren, während mit 150  $\mu g$  Edein/ml und 180  $\mu g$  Edein/ml die intergene bzw. interallele Rekombinationshäufigkeit gesteigert wurde.

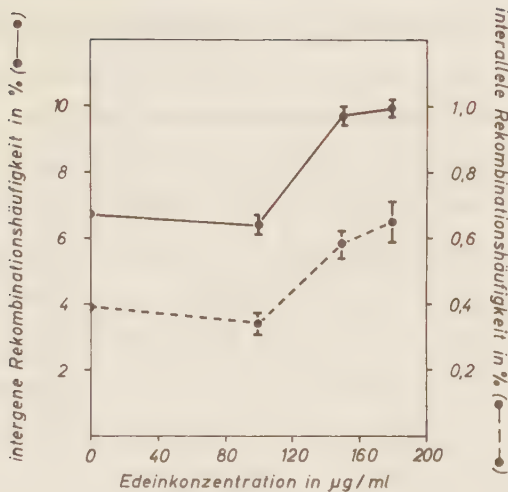


Abb. 6. Einfluß von Edein auf die intergene und interallele Rekombination bei Kreuzungen zwischen den beiden sensiblen Stämmen  $ed^S$ ,  $ad-1$ ,  $pan-2$  ( $B_5$ ),  $a$  und  $ed^S$ ,  $ylo-1$ ,  $pan-2$  ( $B_3$ ),  $tryp-2$ , A. Mittelwerte und statistische Schwankungen aus je 3 unabhängig voneinander durchgeführten Kreuzungen.

#### II.4. Einfluß von Edein auf die Rekombinationshäufigkeit bei edeinresistenten Stämmen

Bei den vorigen Versuchen ergab sich, daß die Anwendungsgrenze von Edein bei Kreuzungen sensibler Stämme bei 180 µg/ml liegt, weil bei höherer Edeinkonzentration keine

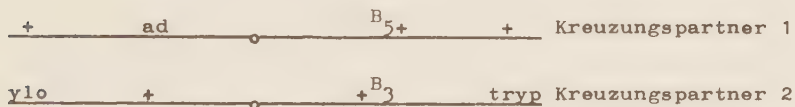
Perithezien mehr gebildet werden. Um auch die Wirkung höherer Konzentrationen von Edein zu prüfen, wurden nun die edein-resistenten Stämme eingesetzt. Kreuzungen zwischen ihnen wurden wiederum auf festem Westergaard-Kreuzungsmedium (vgl. B.2.7), mit verschiedenen Konzentrationen von Edein (von 200  $\mu\text{g/ml}$  bis 750  $\mu\text{g/ml}$ ) angesetzt. Die Ascosporen wurden, wie bei den vorhergehenden Versuchen, suspendiert, geschockt und ausplattiert (vgl. B.10.1.b) und die Prototrophen-Kolonien ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abb. 7 und Abb. 8 dargestellt. Es ist zu sehen, daß die intergene bzw. interallele Rekombinationshäufigkeit bis zur Anwendung der Konzentration von 200  $\mu\text{g}$  Edein/ml steigt (ca. 12 % für die intergene Rekombination und ca. 1 % für die interallele Rekombination), über diese Konzentration hinaus aber keine weitere Steigerung mehr erfolgt.

Aus den Ergebnissen von II.1. bis II.4. läßt sich schließen, daß Edein die Häufigkeit von intergener bzw. interalleler Rekombination deutlich steigert, während die Mutation # 29 allein darauf keinen Einfluß hat.

## II.5. Klassifizierung der Rekombinanten

Um zu klären, durch welchen Rekombinationsmechanismus die verschiedenen Rekombinanten ( $\text{ad}^+$ ,  $\text{tryp}^+$  Prototrophe bzw.  $\text{pan}^+$  Prototrophe) entstanden waren, wurden diese Rekombinanten weiter geprüft. Um das Verständnis des dabei gewählten Vorgehens zu erleichtern, seien zunächst für beide Kreuzungspartner die Positionen der in den Kreuzungen

benutzten pan-Marken auf Kopplungsgruppe VI in Beziehung zu den übrigen Marken schematisch angegeben. Ihre Lage wurde schon von Case und Giles 1958 bestimmt.



Je ca. 250 von den bei den oben genannten Kreuzungen erhaltenen  $ad^+$ ,  $tryp^+$  Prototrophen wurden nun hinsichtlich der Kombination der Außenmarke ylo mit der pan Marke geprüft. Die in Tabelle 10 zusammengestellten Ergebnisse zeigen, daß die meisten der Prototrophen den Genotyp  $pan^-$ ,  $ylo^-$  hatten (ca. 90 %). Das bedeutet, daß diese  $ad^+$   $tryp^+$  Prototrophen durch ein einfaches Crossoverereignis entstanden und solche Ereignisse weder von Edein noch von der Mutation  $ed^r-2$  zur Edeinresistenz beeinflußt wurden.

Je ca. 250 von den bei den oben genannten Kreuzungen erhaltenen  $pan^+$  Prototrophen wurden auf ähnliche Weise hinsichtlich der Kombination der Außenmarke ylo mit ad und tryp geprüft. Um die Interpretation der Ergebnisse zu erleichtern, werden die Prototrophen, deren Außenmarken  $ad^-$  und  $tryp^+$  bzw.  $ad^+$  und  $tryp^-$  sind, die also dieselben Außenmarken wie der eine oder andere Kreuzungspartner tragen, als Nicht-Crossovertypen bezeichnet. Dies entspricht der Terminologie von Case und Giles. Dieser Bezeichnung liegt die Annahme zugrunde, daß Nicht-Crossovertypen durch Gen-Konversion entstanden sein dürften. Alle anderen Prototrophen, solche also, bei denen ein Austausch zwischen den

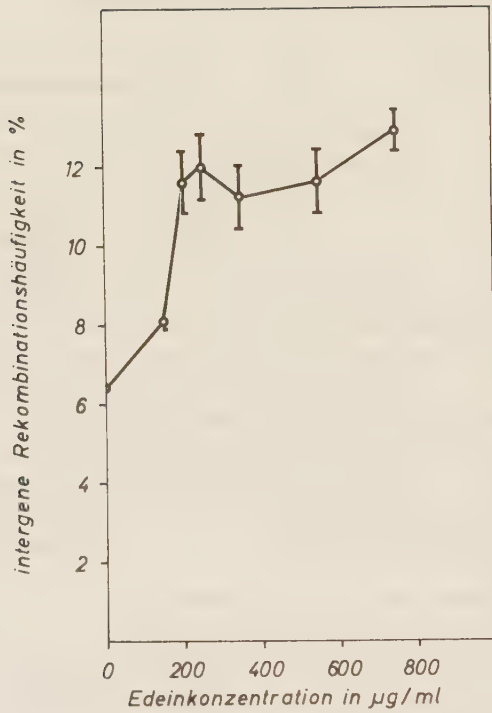


Abb. 7. Einfluß von Edein auf die intergene Rekombination bei Kreuzungen zwischen zwei homoallelen  $ed^r-2$  Mutanten, durchgeführt unter denselben Bedingungen wie bei Abb. 6.

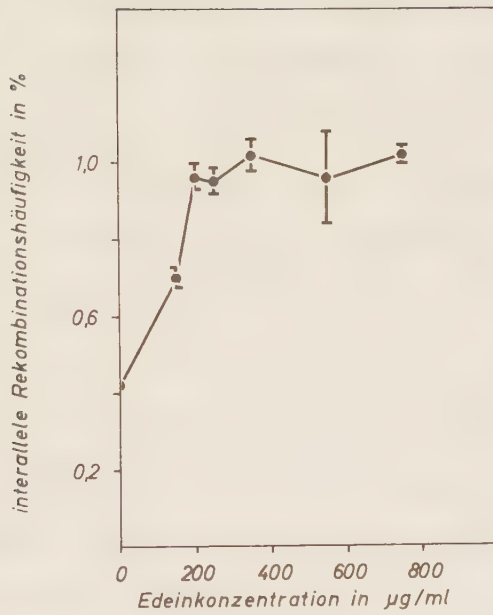


Abb. 8. Einfluß von Edein auf die interallele Rekombination bei Kreuzungen zwischen zwei homoallelen  $ed^r-2$  Mutanten, durchgeführt unter denselben Bedingungen wie bei Abb. 6.

Außenmarken stattgefunden hat, werden als Crossovertypen bezeichnet. Sie werden weiter unterteilt in einfache bzw. doppelte Crossovertypen, abhängig davon, ob ein zusätzlicher Austausch der Marke  $ylo$  vorliegt oder nicht, und ohne Rücksicht darauf, durch welches Ereignis der  $pan^+$  Genotyp entstand. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengestellt. Bei den Kreuzungen  $ed^s \times ed^s$  ohne Edein wurden 37,3 % Prototrophe in der Nicht-Crossover-Klasse und 62,5 % Prototrophe in der Crossover-Klasse erhalten. Der doppelte Crossovertyp war ca. 3 mal häufiger als der einfache Crossovertyp. Bei den Kreuzungen  $ed^r \times ed^r$  ohne Edein wurden nur 6,5 % Prototrophe in der Nicht-Crossover-Klasse, aber 93,4 % in der Crossover-Klasse gefunden. Der doppelte Crossovertyp war nur ca. 2 mal häufiger als der einfache Crossovertyp. Bei den Kreuzungen  $ed^s \times ed^s$  mit 150  $\mu g$  Edein/ml wurden nur 7,6 % Prototrophe in der Nicht-Crossover-Klasse und 92,3 % in der Crossover-Klasse erhalten. Wieder war der doppelte Crossovertyp ca. 2 mal häufiger als der einfache Crossovertyp. Bei den Kreuzungen  $ed^r \times ed^r$  mit 550  $\mu g$  Edein/ml wurden sehr wenige Prototrophe (ca. 0,8 %) in der Nicht-Crossover-Klasse und fast alle anderen in der Crossover-Klasse erhalten (ca. 99,2 %). Im Gegensatz zu den anderen Kreuzungen war hier der einfache Crossovertyp viel häufiger als der doppelte Crossovertyp.

Sowohl die Mutation zur Edeinresistenz als auch das Edein vermindern also die relative Anzahl der Nicht-Crossover-Isolate, steigern aber die relative Anzahl der Crossover-

Isolate. Beide Faktoren gemeinsam scheinen sich in dieser Wirkung zu potenzieren. Innerhalb der Klasse der Crossover-Isolate steigern beide Faktoren einzeln betrachtet die Anzahl der einfachen Crossovertypen. Kombiniert steigern sie diese Anzahl weiter auf Kosten der doppelten Crossovertypen.

Tabelle 10

| Kreuzung                                             | Anzahl der plattier-<br>ten lebensfähigen<br>Ascosporen | Anzahl der gefunde-<br>nen ad <sup>+</sup> , trypt<br>Prototrophen | Häufigkeit der<br>ad <sup>+</sup> , trypt <sup>+</sup> Proto-<br>trophen in % | Kombination der<br>ylo u. pan Marken<br>in den ad <sup>+</sup> , trypt <sup>+</sup><br>Prototrophen in % |
|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $ed^s ylo^+ ad^- B_3 trypt^+$<br>x                   | 10980                                                   | 751                                                                | 6,8                                                                           | 4,4 1,3 1,8 92,4                                                                                         |
| $ed^s ylo^- ad^+ B_3 trypt^-$<br>ohne Edein          |                                                         |                                                                    |                                                                               |                                                                                                          |
| $ed^r ylo^+ ad^- B_5 trypt^+$<br>x                   | 30000                                                   | 2010                                                               | 6,7                                                                           | 1,7 3,9 2,6 91,7                                                                                         |
| $ed^r ylo^- ad^+ B_5 trypt^-$<br>ohne Edein          |                                                         |                                                                    |                                                                               |                                                                                                          |
| $ed^s ylo^+ ad^- B_5 trypt^+$<br>x                   | 14190                                                   | 1516                                                               | 10,7                                                                          | 10,3 3,3 2,9 83,5                                                                                        |
| $ed^s ylo^- ad^+ B_5 trypt^-$<br>mit 150 µg Edein/ml |                                                         |                                                                    |                                                                               |                                                                                                          |
| $ed^r ylo^+ ad^- B_5 trypt^+$<br>x                   | 26810                                                   | 3500                                                               | 13,1                                                                          | 2,6 3,5 3,0 90,8                                                                                         |
| $ed^r ylo^- ad^+ B_5 trypt^-$<br>mit 550 µg Edein/ml |                                                         |                                                                    |                                                                               |                                                                                                          |

Genotyp von ad<sup>+</sup>, trypt<sup>+</sup> Prototrophen, erhalten in verschiedenen Kreuzungen

Tabelle 11

| Kreuzung                                                                                                                                                                                                     | Anzahl der plattier-<br>ten lebensfähigen<br>Ascosporen | Anzahl der gefunde-<br>nen pan <sup>+</sup> Proto-<br>trophen | Kombination der ad, tryp und ylo<br>Marken in den pan <sup>+</sup> Prototrophen in % |                 |     |                 |                   |                 |                   |                  |                  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----|-----------------|-------------------|-----------------|-------------------|------------------|------------------|
|                                                                                                                                                                                                              |                                                         |                                                               | Crossover                                                                            |                 |     |                 |                   |                 |                   |                  |                  |
|                                                                                                                                                                                                              |                                                         |                                                               | Nicht-Crossover                                                                      |                 |     | Crossover       |                   |                 |                   |                  |                  |
|                                                                                                                                                                                                              |                                                         |                                                               |                                                                                      |                 |     | einfach         | doppelt           |                 |                   |                  |                  |
|                                                                                                                                                                                                              |                                                         |                                                               | ad <sup>+</sup>                                                                      | ad <sup>+</sup> | +   | ad <sup>+</sup> | tryp <sup>+</sup> | ad <sup>+</sup> | tryp <sup>+</sup> | ylo <sup>+</sup> | ylo <sup>+</sup> |
| ed <sup>s</sup> ylo <sup>+</sup> ad <sup>-</sup> B <sub>5</sub> tryp <sup>+</sup><br>x <sup>+</sup> ed <sup>s</sup> ylo <sup>-</sup> ad <sup>+</sup> B <sub>3</sub> tryp <sup>-</sup><br>ohne Edein          | 109800                                                  | 448                                                           | 12,9                                                                                 | 0               | 0   | 24,4            | 6,7               | 7,9             | 5,7               | 42,2             |                  |
|                                                                                                                                                                                                              |                                                         |                                                               | 37,3                                                                                 |                 |     | 62,5            |                   |                 |                   |                  |                  |
| ed <sup>r</sup> ylo <sup>+</sup> ad <sup>-</sup> B <sub>5</sub> tryp <sup>+</sup><br>x <sup>+</sup> ed <sup>r</sup> ylo <sup>-</sup> ad <sup>+</sup> B <sub>3</sub> tryp <sup>-</sup><br>ohne Edein          | 300000                                                  | 1200                                                          | 0,4                                                                                  | 1,2             | 0   | 4,9             | 2,1               | 32,6            | 3,3               | 55,6             |                  |
|                                                                                                                                                                                                              |                                                         |                                                               | 6,5                                                                                  |                 |     | 93,4            |                   |                 |                   |                  |                  |
| ed <sup>s</sup> ylo <sup>+</sup> ad <sup>-</sup> B <sub>5</sub> tryp <sup>+</sup><br>x <sup>+</sup> ed <sup>s</sup> ylo <sup>-</sup> ad <sup>+</sup> B <sub>3</sub> tryp <sup>-</sup><br>mit 150 µg Edein/ml | 141900                                                  | 926                                                           | 0,7                                                                                  | 1,0             | 0,7 | 5,2             | 0,1               | 26,4            | 0,3               | 64,6             |                  |
|                                                                                                                                                                                                              |                                                         |                                                               | 7,6                                                                                  |                 |     | 92,3            |                   |                 |                   |                  |                  |
| ed <sup>r</sup> ylo <sup>+</sup> ad <sup>-</sup> B <sub>5</sub> tryp <sup>+</sup><br>x <sup>+</sup> ed <sup>r</sup> ylo <sup>-</sup> ad <sup>+</sup> B <sub>3</sub> tryp <sup>-</sup><br>mit 550 µg Edein/ml | 268100                                                  | 3300                                                          | 0                                                                                    | 0               | 0   | 0,8             | 2,9               | 68,4            | 1,2               | 26,6             |                  |
|                                                                                                                                                                                                              |                                                         |                                                               | 0,8                                                                                  |                 |     | 99,2            |                   |                 |                   |                  |                  |

Genotyp von pan<sup>+</sup> Prototrophen, erhalten in verschiedenen Kreuzungen

### III. Versuche zur Ermittlung der molekularen Ursachen der Effekte

Um erste Hinweise auf mögliche molekulare Ursachen der Steigerung der absoluten Rekombinationshäufigkeit und der Verschiebung in der relativen Häufigkeit bestimmter Rekombinantenklassen durch Edein oder die Mutation zur Edeinresistenz zu erhalten, wurden die folgenden 2 Faktoren geprüft: 1. Nukleaseaktivität, 2. Photoreaktivierung und Dunkel-Reparatur. Da Nukleasen an der Rekombination bei Prokaryonten beteiligt sind, war denkbar, daß die hier beobachteten Effekte auf eine mutative oder durch Edein bedingte Änderung der Nukleaseaktivität zurückgehen. Da andererseits, ebenfalls bei Prokaryoten, auch ein Zusammenhang zwischen Reparatur und Rekombination besteht, schien eine Verursachung der beobachteten Effekte durch Änderungen in Reparaturenzymen denkbar.

#### III.1. Nukleaseaktivitätsbestimmung bei edeinresistenten Mutanten

Die Nukleaseaktivität der edeinresistenten Mutanten #18 und #29 im Vergleich zu derjenigen des Wildtyps wurde nach zwei Methoden bestimmt und zwar: 1. Bestimmung der extrazellulären Nukleasen durch Messung des Myzelwachstums in RNS-haltigem Medium. <sup>\*)</sup> 2. Bestimmung der Nukleasen durch Messung des Abbaus von DNS in Zellextrakten.

<sup>\*)</sup> Fußnote: Die wenigen bisher bei Neurospora bekannten Nukleasen sind, sofern sie DNS abbauen, auch aktiv an RNS als Substrat (vgl. Linn und Lehman, J. Biol. Chem. 240, 1294 und 241, 2694, sowie die im Literaturverzeichnis angegebenen Publikationen aus der Gruppe von Ishikawa).

### III.1.a Myzelwachstum edeinresistenter Mutanten in RNS-haltigem Medium

Bei diesem Test wird im Medium an Stelle von Phosphat RNS angeboten, die nur von Stämmen mit extrazellulärer Nukleaseaktivität als Phosphatquelle genutzt werden kann. Das Myzelwachstum wurde nach Ishikawa, Toh-E, Uno und Hasunuma (1969 und 1971) durch Bestimmung des Trockengewichts verfolgt (vgl. B.14.1). Die Ergebnisse in Abb. 9 zeigen, daß die Mutante # 18 in etwa die gleiche Nukleaseaktivität wie der Wildtyp besitzt. Die Mutante # 29 zeigt im Vergleich zum Wildtyp und der Mutante # 18 eine geringfügige Steigerung der Nukleaseaktivität. Dieser Unterschied ist jedoch kaum signifikant. Bei dem soeben beschriebenen Versuch wurden Konidien vom Wildtyp und von den edeinresistenten Mutanten # 18 bzw. # 29, die auf edeinfreiem Medium herangewachsen waren, benutzt. Wie früher gezeigt, bilden die Mutanten ohne Edein nur einen geringen Prozentsatz edeinresistenter Konidien. Dies könnte bedingen, daß die gesuchten Effekte nicht klar genug in Erscheinung traten. Bei Anzucht von Myzelien der Mutanten auf Medium mit Edein werden hingegen Konidien gebildet, die sämtlich edeinresistent sind. Sollte die Resistenz also etwas mit der Nukleaseaktivität zu tun haben, so müßte die Verwendung solcher Konidein die Effekte verstärken. Es wurden daher in einem weiteren Versuch Konidien, die von edeinhaltigem Medium (150  $\mu$ g Edein/ml für den Wildtyp und 300  $\mu$ g Edein/ml für die edeinresistenten Mutanten) geerntet waren, benutzt. Der Versuchsablauf entsprach im übrigen dem des vorigen Versuchs.

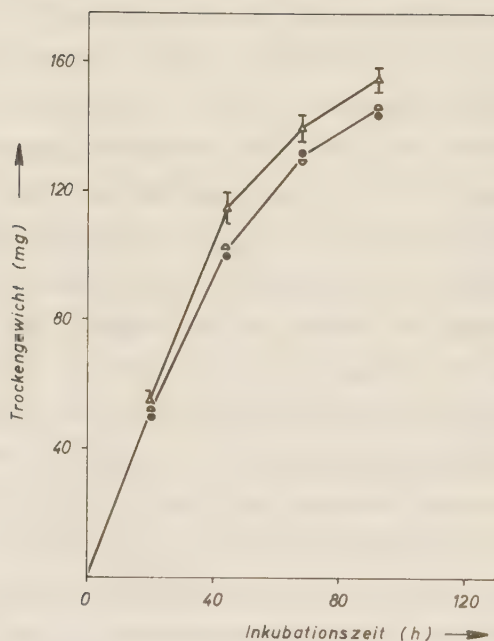


Abb. 9. Wachstumskurven des Wildtyps (●) und der edeinresistenten Mutanten # 18 (○) bzw. # 29 (Δ) auf mit 100  $\mu$ g RNS/l supplementiertem phosphatfreiem Medium. Die Inkubation der Konidien suspensionen ( $1 \times 10^6$ /ml) erfolgte in 100 ml Erlenmeyer-Kolben mit 50 ml RNS Medium bei 25° C für verschiedene Zeiträume (von 20 bis zu 92 H). Das Wachstum ist in mg Myzel-trockengewicht je Kolben ausgedrückt. Mittelwerte

und statistische Schwankungen aus je 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

---

Der Vergleich der Trockengewichte von Wildtyp und Mutanten, die unter diesen Bedingungen erhalten wurden (Abb. 10) und der Vergleich von Abb. 10 mit Abb. 9 zeigt, daß die betreffenden Mutationen keinen Einfluß auf die Nukleaseaktivität haben. Im übrigen scheint danach auch Edein selbst die Nukleaseaktivität nicht zu beeinflussen.

### III.1.b Nukleaseaktivitätsbestimmung durch Messung des Abbaus von DNS in Zellextrakten

Die bei diesem Experiment eingesetzte DNS waren verkleinerte Ringgenome des Phagen Lambda ( $\lambda$  dv). Diese lagen in 2 Formen - als überspiralisierte doppelsträngige Ringe oder als entspannte doppelsträngige Ringe - vor. Das Gemisch entsteht dadurch, daß ein Teil der nativen überspiralisierten DNS mit zunehmendem Alter durch Einzelstrangbrüche in die entspannte Form übergeht. Überspiralisierte und entspannte DNS lassen sich durch Zentrifugation in CsCl-Ethidiumbromid Dichtegradienten trennen. Dabei weist die überspiralisierte Form eine höhere Dichte als die entspannte Form auf. Da Nukleasen als Endonukleasen Einzelstrangbrüche induzieren, begünstigen sie bei Einwirkung auf die überspiralisierte Form deren Übergang in die entspannte Form und werden so nachweisbar. Da sie andererseits als Exonukleasen DNS Stränge vom Ende her ab-

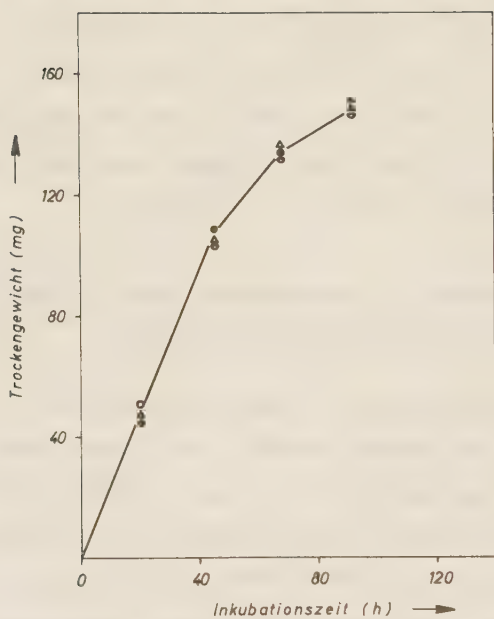


Abb. 10. Wie Abb. 9. Die für die Beimpfung der Kolben verwendeten Konidien stammten jedoch im Gegensatz zu den dort verwendeten von Kulturen, die in Gegenwart von Edein wuchsen.

bauen, führen sie durch Vergrößerung solcher Lücken schließlich zum Zerfall der Ringe, was ebenfalls nachweisbar ist. Bei diesem Versuch (vgl. B.14.2) wurden wieder die beiden edeinresistenten Mutanten #18 bzw. #29 und der Wildtyp benutzt. Aus Myzelien dieser Stämme wurden Extrakte gewonnen und die DNS damit inkubiert (vgl. B.14.2).

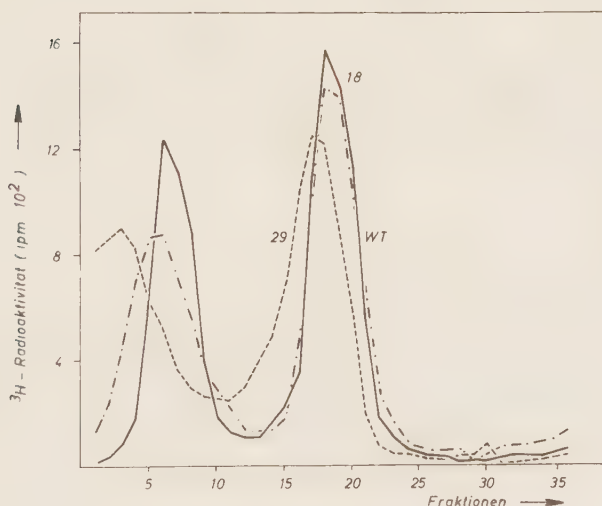


Abb. 11. Profil eines CsCl-Ethidiumbromid Dichtegradienten zu Beginn der Inkubation von  $\lambda$  dv DNS mit Extrakten des Wildtyps (— · — ·) bzw. der edeinresistenten Mutanten #18 (—) und #29 (-----) von Neurospora.

Aus Abb. 11 ist zu ersehen, daß bei Beginn der Inkubation mit den Extrakten der 3 verschiedenen Stämme (Zeitpunkt 0')

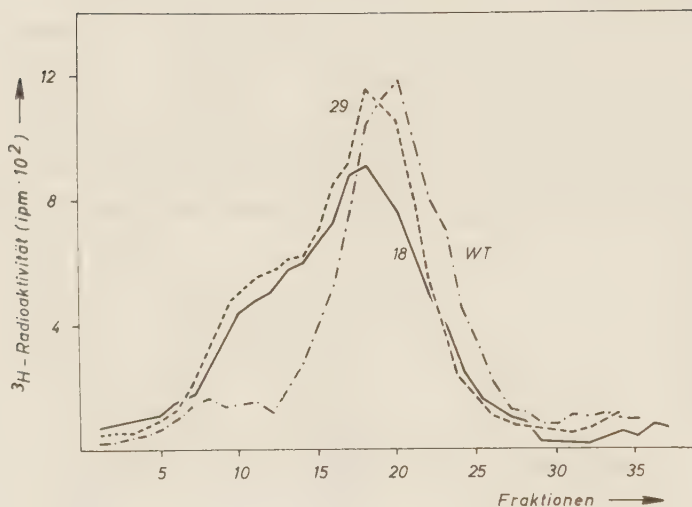


Abb. 12. Profil eines CsCl-Ethidiumbromid Dichtegradienten nach 120 minütiger Inkubation von  $\lambda$  dv DNS mit Estrakten des Wildtyps (---) bzw. der edeinresistenten Mutanten # 18 (—) und # 29 (— · —) von Neurospora.

die  $\lambda$  dv DNS noch in den beiden Formen vorliegt (2 Peaks).

Nach 120' Inkubation mit Wildtypextrakt (Abb. 12) ist praktisch die gesamte ehemals überspiralisierte DNS in die entspannte Form übergeführt, für Mutantenextrakte ist noch eine leichte Schulter, möglicherweise als Rest von überspiralisierter DNS zu sehen.

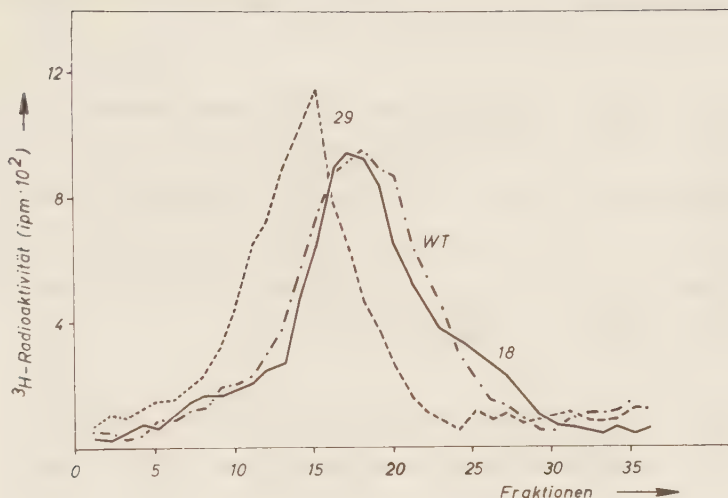


Abb. 13. Profil eines CsCl-Ethidiumbromid Dichtegradienten nach 240 minütiger Inkubation von  $\lambda$  dv DNS mit Extrakten des Wildtyps (— · — ·) bzw. der edeinresistenten Mutanten # 18 (——) und # 29 (-----) von *Neurospora*.

Aus Abb. 13 kann man ersehen, daß nach 4 stündiger Inkubation gegenüber dem vorigen Bild kein größerer Unterschied mehr auftritt. Bei den Mutanten ist die leichte Schulter des Profils, die bei 120' noch erkennbar ist, verschwunden. Bemerkenswert ist, daß bis zu diesem Zeitpunkt der Inkubation die gesamte Radioaktivität der Peaks, bestimmt durch Planimetrieren der Flächen unter dem Kurvengang, für den Wildtyp und beide Mutanten ungefähr gleich bleibt. Mono-

nukleotide werden also noch nicht in größerer Zahl freigesetzt.

Die Ergebnisse dieser Versuche lassen keine Schlüsse auf eine signifikante Änderung der Nukleaseaktivität der edeinresistenten Mutanten im Vergleich zum Wildtyp zu. Der sich in Abb. 12 abzeichnenden leichten Verringerung der Endonukleaseaktivität bei den edeinresistenten Mutanten sollte jedoch noch nachgegangen werden.

### III.2. Photoreaktivierung und Dunkel-Reparatur bei edeinresistenten Mutanten in Abwesenheit bzw. Gegenwart von Edein

Die Photoreaktivierung und Dunkel-Reparatur wurden an UV-bestrahlten Zellen untersucht. Dabei wurde das Hauptaugenmerk auf etwaige Unterschiede in der Überlebensrate UV-bestrahlter Konidien des Wildtyps und der Mutanten gerichtet, wenn im Dunkeln gearbeitet wurde, wo nur die Exzisions- und Rekombinations-Reparatur zur Wirkung kommen können.

#### III.2.a Photoreaktivierung und Dunkel-Reparatur des Wildtyps nach Plattierung ohne bzw. mit Edein

In Abb. 14 sind Ergebnisse von Messungen zur Photo- und Dunkel-Reparatur (vgl. B.15) des Wildtyps nach Plattierung ohne bzw. mit Edein beschrieben. Man kann aus ihr entnehmen, daß die Wildtypzellen bei Plattierung mit 150  $\mu$ g Edein/ml noch Kolonien zu bilden vermögen. Ohne UV-

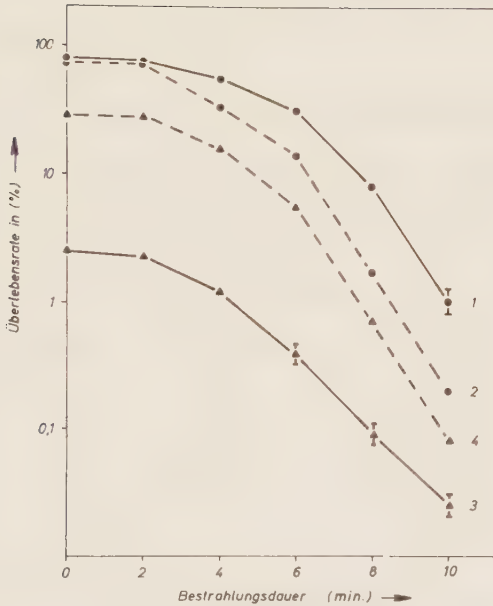


Abb. 14. UV-Inaktivierungskurven für Wildtypkonidien. Die Konidien wurden nach der Bestrahlung auf Medium ohne bzw. mit 150  $\mu$ g Edein/ml plattiert und im Licht bzw. im Dunkeln bebrütet.

Kurve 1 - im Licht ohne Edein (●—●)

Kurve 2 - im Dunkeln ohne Edein (●----●)

Kurve 3 - im Licht mit Edein (▲—▲)

Kurve 4 - im Dunkeln mit Edein (▲----▲)

Die eingetragenen Punkte stellen Mittelwerte aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dar. Schwankungen sind nur dort eingezeichnet, wo sie größer waren als die verwendeten Symbole.

---

Bestrahlung (Zeitpunkt 0) waren es im Dunkeln z. B. 30 %, mit Licht nur 2,5 % der plattierten Zellen. Der Effekt im Dunkeln sei als "unspezifischer Edeineffekt auf die Überlebensrate", das Ausmaß der Verstärkung dieses Effekts durch Licht als "Lichtsensibilisierung des unspezifischen Edeineffekts" bezeichnet. Auf den zuletzt genannten Effekt, der unerwartet war, wird später noch eingegangen. Mit UV-Bestrahlung nahm die Überlebensrate unter allen Bedingungen bei Steigerung der UV-Dosis ab, bei dem Versuch ohne Edein im Dunkeln (Kurve 2) rascher als im Licht (Kurve 1, Photoreaktivierung). Der Verlauf der im Dunkeln erhaltenen Inaktivierungskurve (also Exzisions- und/oder Rekombinations-Reparatur) wurde durch Edein nicht beeinflusst (Kurve 4 parallelverschoben zu Kurve 2). Auch der Verlauf der im Licht erhaltenen Inaktivierungskurve blieb durch Edein unberührt (Kurve 3 parallelverschoben nahezu gleich Kurve 1). Es folgt, daß Edein bei UV-bestrahlten Wildtypzellen weder das Ausmaß der Photoreaktivierung noch jenes der Dunkel-Reparatur beeinflusst.

III.2.b Photoreaktivierung und Dunkel-Reparatur des Wildtyps, gezüchtet auf edeinhaltigem Medium, nach Plattierung ohne bzw. mit Edein

Die Ergebnisse in Abb. 15 zeigen, daß auch hier, wie bei

Zellen des Wildtyps, die ohne Edein gewonnen wurden (vgl. C.III.2.a), der unspezifische Edeineffekt auf die Überlebensrate sowie die Lichtsensibilisierung des unspezifischen Edeineffekts auftritt. Ohne UV-Bestrahlung (Zeitpunkt 0) keimten bei Plattierung mit Edein im Dunkeln 24 %, im Licht 2,6 % der ins Medium eingebrachten Zellen. Der Verlauf der Inaktivierungskurven nach UV-Bestrahlung ist flacher als in Abb. 14, jedoch ist wieder Kurve 4 parallelverschoben zu Kurve 2 und Kurve 3 parallelverschoben zu Kurve 1, woraus folgt, daß auch bei den hier benutzten Zellen Edein weder das Ausmaß der Photoreaktivierung noch jenes der Dunkel-Reparatur beeinflußt. Im übrigen ist das Ausmaß der Photoreaktivierung ohne Edein (Kurve 1 - 2) in etwa gleich dem für Wildtypzellen, die ohne Edein gezüchtet wurden (s. Abb. 14). Auch das Ausmaß der Photoreaktivierung mit Edein (Differenz Kurve 3 minus Kurve 4 nach Parallelverschiebung von Kurve 3 in den Anfangspunkt von Kurve 4) entspricht in etwa dem aus Abb. 14 zu ermittelnden. Aus dem flacheren Verlauf der 4 Inaktivierungskurven, verglichen mit jenen in Abb. 14, läßt sich schließen, daß durch Anzucht des Wildtyps von Neurospora auf edeinhaltigem Nährboden die UV-Empfindlichkeit der entstehenden Konidien verringert wird.

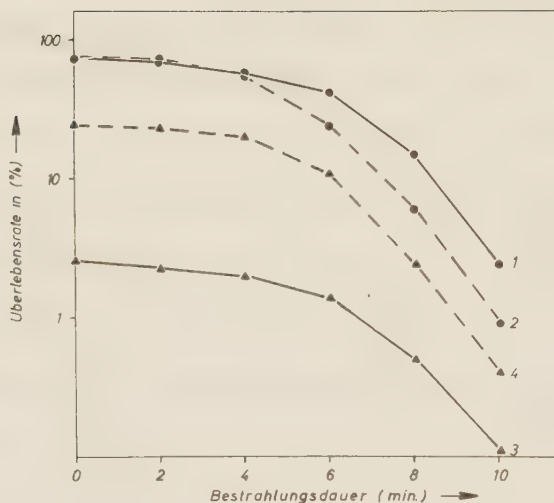


Abb. 15. UV-Inaktivierungskurven für Wildtypkonidien, geerntet von edeinhaltigem Medium. Die Konidien wurden nach der Bestrahlung auf Medium ohne bzw. mit 150  $\mu$ g Edein/ml plattiert und im Licht bzw. im Dunkeln bebrütet.

Kurve 1 - im Licht ohne Edein (●—●)

Kurve 2 - im Dunkeln ohne Edein (●----●)

Kurve 3 - im Licht mit Edein (▲—▲)

Kurve 4 - im Dunkeln mit Edein (▲----▲)

Die eingetragenen Punkte stellen Mittelwerte aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dar. Hinsichtlich der Fehlerschwankungen vgl. Abb. 14.

III.2.c.α Photoreaktivierung und Dunkel-Reparatur der  
edeinresistenten Mutanten, nach Platttierung  
auf Medium ohne bzw. mit Edein

Aus Abb. 16 ist bei Vergleich mit Abb. 14 zu ersehen, daß die Mutante #18 in Abwesenheit von Edein die gleichen Inaktivierungskurven wie der Wildtyp ergibt. Es wird also durch die Mutation #18 weder die Photoreaktivierung (Kurve 1 - Kurve 2) noch die Dunkel-Reparatur (Kurve 2) beeinflusst. Diese Mutante gibt mit 200  $\mu$ g Edein/ml, obwohl genotypisch resistent, nur eine geringe Zahl von Kolonien (Kurve 3, Wert 0 Minuten, unspezifischer Edeineffekt auf die Überlebensrate). Diese Zahl ist im Licht und Dunkeln nahezu gleich. Es fehlt hier also die Lichtsensibilisierung des unspezifischen Edeineffekts. Trägt man dem Rechnung, so ist auch bei Platttierung mit Edein kein Unterschied im Kurvenverlauf, verglichen mit dem in Abb. 14, zu erkennen, da Kurve 3 und 4 aus der vorliegenden Abb. 16 nach Parallelverschiebung in etwa den Kurven 3 und 4 aus Abb. 14 entsprechen. Das bedeutet, daß die Mutation #18 auch in Kombination mit Edein weder Photoreaktivierung noch Dunkel-Reparatur beeinflusst.

Die Mutante #29 wird im Vergleich zum Wildtyp und der Mutante #18 durch UV-Bestrahlung bei anschließender Platttierung ohne Edein, aber auch bei Platttierung mit Edein, weniger rasch aktiviert. Dies gilt für Kultur im Licht und im Dunkeln (s. Abb. 17). Die Mutation #29 verringert also, so wie Anzucht von Wildtypzellen auf edein-

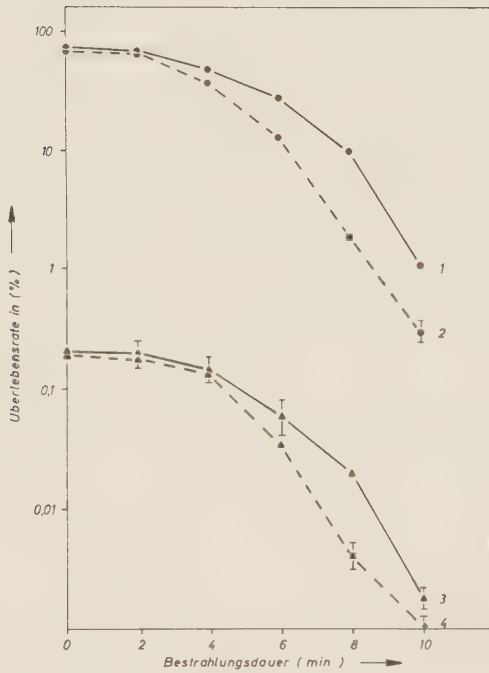


Abb. 16. UV-Inaktivierungskurven für Konidien der edeinresistenten Mutante #18. Die Konidien wurden nach der Bestrahlung auf Medium ohne bzw. mit 200  $\mu$ g Edein/ml plattiert und im Licht bzw. im Dunkeln bebrütet.

Kurve 1 - im Licht ohne Edein (●—●)

Kurve 2 - im Dunkeln ohne Edein (●----●)

Kurve 3 - im Licht mit Edein (▲—▲)

Kurve 4 - im Dunkeln mit Edein (▲----▲)

Die eingetragenen Punkte stellen Mittelwerte aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dar. Hinsichtlich der Fehlerschwankungen vgl. Abb. 14.

---

haltigem Nährboden, die UV-Empfindlichkeit der Zellen. Die Überlebensrate unbestrahlter Konidien in Gegenwart von 200  $\mu$ g Edein/ml ist höher als bei der Mutante #18, jedoch auch hier im Licht und im Dunkeln nahezu gleich, so daß wiederum die Lichtsensibilisierung des unspezifischen Edeineffekts fehlt. Die Differenz zwischen Kurve 1 und 2 und Kurve 3 und 4 ist in etwa gleich den bisher beschriebenen analogen Differenzen, das Ausmaß der Photoreaktivierung ist also unbeeinflusst. Die Kurven 2 und 4, die wieder parallelverschoben gleich verlaufen, zeigen, daß das Ausmaß der Dunkel-Reparatur durch Edein nicht beeinflusst wird.

#### III.2.c.ß Photoreaktivierung und Dunkel-Reparatur der edeinresistenten Mutanten, gezüchtet auf edeinhaltigem Medium, nach Plattierung ohne bzw. mit Edein

Wie beim Wildtyp, so wurden auch die beiden resistenten Mutanten in Ergänzung der vorstehend beschriebenen Versuche zusätzlich auf Medium mit Edein angezüchtet und die entstehenden Konidien in weiteren Versuchen benutzt.

Bei der Mutante #18 ist unter diesen Bedingungen, wie

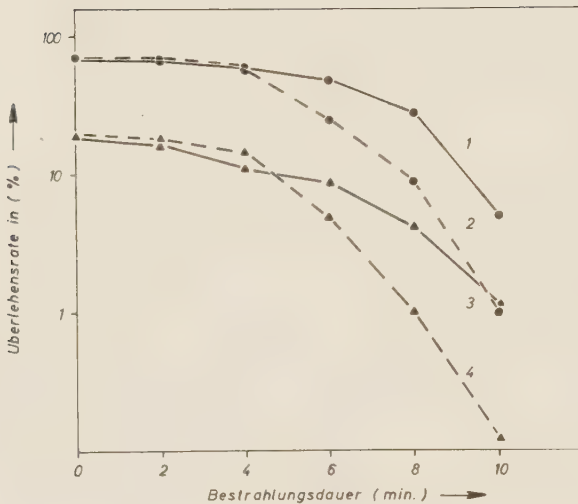


Abb. 17. UV-Inaktivierungskurven für Konidien der edeinresistenten Mutante #29. Die Konidien wurden nach der Bestrahlung auf Medium ohne bzw. mit 200  $\mu$ g Edein/ml plattiert und im Licht bzw. im Dunkeln bebrütet.

Kurve 1 - im Licht ohne Edein (●—●)

Kurve 2 - im Dunkeln ohne Edein (●----●)

Kurve 3 - im Licht mit Edein (▲—▲)

Kurve 4 - im Dunkeln mit Edein (▲----▲)

Die eingetragenen Punkte stellen Mittelwerte aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dar. Hinsichtlich der Fehlerschwankungen vgl. Abb. 14.

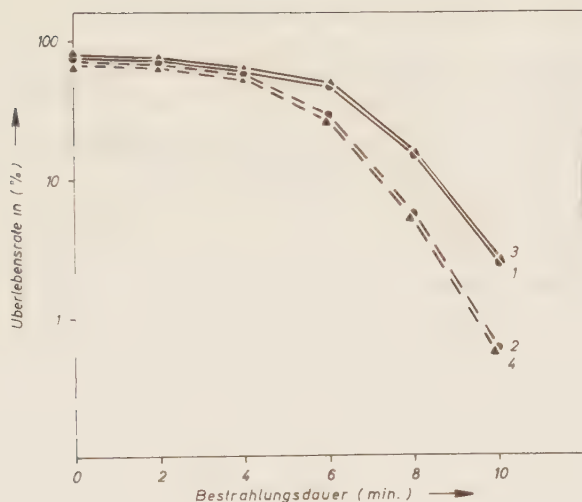


Abb. 18. UV-Inaktivierungskurven für Konidien der edeinresistenten Mutante #18, geerntet von edeinhaltigem Medium. Die Konidien wurden nach der Bestrahlung auf Medium ohne bzw. mit 200  $\mu$ g Edein/ml plattiert und im Licht bzw. im Dunkeln bebrütet.

Kurve 1 - im Licht ohne Edein (●—●)

Kurve 2 - im Dunkeln ohne Edein (●----●)

Kurve 3 - im Licht mit Edein (▲—▲)

Kurve 4 - im Dunkeln mit Edein (▲----▲)

Die eingetragenen Punkte stellen Mittelwerte aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dar. Hinsichtlich der Fehlerschwankungen vgl. Abb. 14.

beim Wildtyp, der Verlauf der Inaktivierungskurven abgeflacht, die Empfindlichkeit der Zellen gegen die UV-Bestrahlung ist also verringert (Abb. 18, vgl. mit Abb. 15). Im Gegensatz zum Wildtyp gibt es hier keinen unspezifischen Edeineffekt auf die Überlebensrate. Auch eine Lichtsensibilisierung des unspezifischen Edeineffekts liegt, wie schon bei Anzucht der Mutante ohne Edein, nicht vor. Die Kurven 1 und 3 bzw. 2 und 4 fallen daher jetzt zusammen. Die Photoreaktivierung ist bei Plattierung mit und ohne Edein gleich, wie beim Wildtyp.

Auch bei der Mutante #29 ist, wie beim Wildtyp und der Mutante #18, eine verringerte generelle Empfindlichkeit gegen UV zu verzeichnen, doch ist die Verringerung deutlich stärker als bei diesen (Abb. 19). Auch bei Mutante #29 fehlt jetzt der unspezifische Edeineffekt auf die Überlebensrate und die beim Wildtyp beobachtete Lichtsensibilisierung. Das Ausmaß der Photoreaktivierung ist bei Plattierung ohne und mit Edein gleich. Für 10 Minuten UV-Bestrahlung wurde keine Photoreaktivierung erhalten.

Die in Abschnitt III.2. bisher besprochenen Versuche zeigen zusammenfassend, daß weder Edein selbst noch die beiden geprüften Mutationen zur Edeinresistenz die Photoreaktivierung beeinflussen. Die Dunkel-Reparatur wird nicht verringert, möglicherweise aber durch Anzucht der Zellen mit Edein und durch die Mutation #29 aktiviert. Der Kurvenverlauf der im Dunkeln durchgeführten Versuche setzt sich aus 3 Komponenten zusammen: a) nicht reparable Tref-

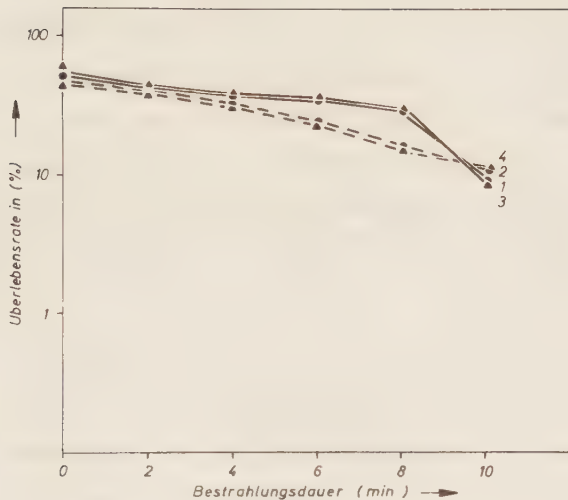


Abb. 19. UV-Inaktivierungskurven für Konidien der edeine-resistenten Mutante #29, geerntet von edeinehaltigem Medium. Die Konidien wurden nach der Bestrahlung auf Medium ohne bzw. mit 200  $\mu$ g Edein/ml plattiert und im Licht bzw. im Dunkeln bebrütet.

Kurve 1 - im Licht ohne Edein (●—●)

Kurve 2 - im Dunkeln ohne Edein (●----●)

Kurve 3 - im Licht mit Edein (▲—▲)

Kurve 4 - im Dunkeln mit Edein (▲----▲)

Die eingetragenen Punkte stellen Mittelwerte aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dar. Hinsichtlich der Fehlerschwankungen vgl. Abb. 14.

fer, b) Treffer, welche durch Exzision repariert werden, und c) Treffer, welche durch Rekombination repariert werden. Nach Anzucht der Zellen mit Edein und in der Mutante # 29 könnte eine dieser Komponenten verändert oder aber auch die Zahl der Treffbereiche erhöht sein. Für die Mutante # 29 wurde bereits gezeigt (s. Tabelle 9), daß ihre Rekombinationsrate gegenüber dem Wildtyp nicht erhöht ist. Für sie scheidet also eine Änderung der Rekombinations-Reparatur aus.

Die etwaige Erhöhung der Zahl der Treffbereiche in den Zellen dieses Stammes sowie in den Zellen des Wildtyps durch Anzucht mit Edein wurde geprüft. Eine Volumenzunahme der Zellen von *E. coli* in Gegenwart von Edein wurde bereits von Kurylo-Borowska beschrieben (1962).

Volumenmessungen von *Neurospora* Konidien, die mit bzw. ohne Edein gezüchtet wurden, ergaben (s. B. 16 und Abb. 20 und Abb. 21), daß auch hier, unter dem Einfluß von Edein, der Anteil der Konidien mit größerem Volumen in einer Konidienpopulation zunimmt. Das gilt für den Wildtyp und die Mutante # 29. Kernzählungen an solchen Konidien (s. B. 17) ergaben erwartungsgemäß eine Erhöhung der mittleren Kernzahl und damit der Zahl der Treffbereiche nach Anzucht mit Edein (s. Abb. 22 und Abb. 23).

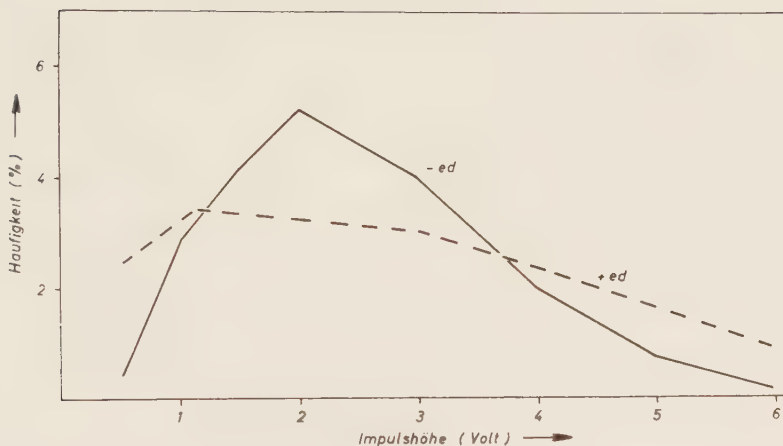


Abb. 20. Darstellung der Volumenverteilung für Konidien des Wildtyps, gemessen nach dem verbesserten Coulter-Meßverfahren. Es ist die Größe der Zellpartikel, ausgedrückt durch ihre Impulshöhe in Volt, gegen ihre relative Häufigkeit aufgetragen.

----- Konidien, gezüchtet auf Medium mit 150  $\mu$ g Edein/ml  
—— Konidien, gezüchtet auf Medium ohne Edein

Beim Wildtyp wurde die mittlere Kernzahl von  $1,8 \pm 0,06$  auf  $3,1 \pm 0,08$  erhöht. Für die Mutante # 29 waren die Werte entsprechend (Erhöhung von  $2,1 \pm 0,08$  auf  $3,4 \pm 0,11$ ). Insbesondere unterscheidet sich der ohne Edein erhaltene

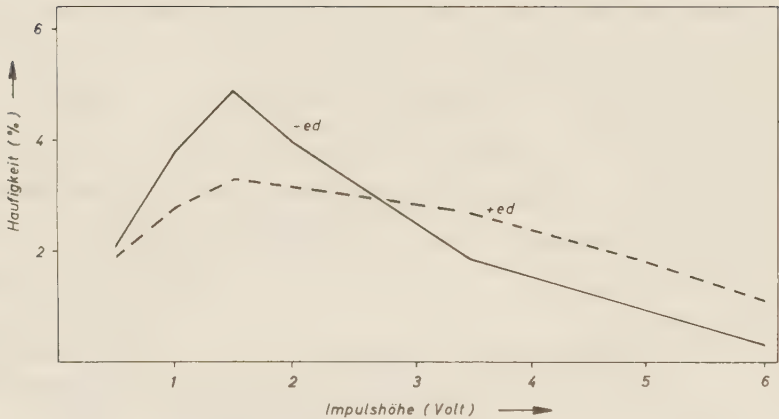


Abb. 21. Darstellung der Volumenverteilung für Konidien der edeinresistenten Mutante # 29, gemessen nach dem verbesserten Coulter-Meßverfahren. Es ist die Größe der Zellpartikel, ausgedrückt durch ihre Impulshöhe in Volt, gegen ihre relative Häufigkeit aufgetragen.

---- Konidien, gezüchtet auf Medium mit 200  $\mu$ g Edein/ml  
— Konidien, gezüchtet auf Medium ohne Edein

Wert kaum von dem für Wildtyp Konidien. Der Versuch, diese durch Kernzählung ermittelten Zahlenwerte durch eine vergleichende Betrachtung des Verlaufs der zugehörigen Inaktivierungskurven (Abb. 14, 15, 17, 19) zu erhärten, brachte keine brauchbaren Resultate, da nach Edeinvorbehandlung nicht

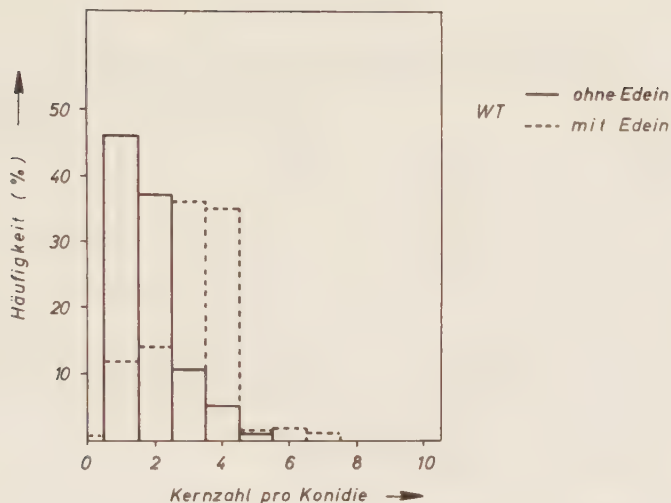


Abb. 22. Häufigkeitsverteilung der Anzahl von Kernen in Konidien des Wildtyps, nach Anzucht der Myzelien ohne (—) bzw. mit (----) Edein.

nur die Schulter der jeweiligen Kurven verbreitert, sondern zusätzlich auch die Steigung des linearen Astes dieser Kurven verändert (verringert) ist. Dies verbietet Rückschlüsse auf eine Änderung der Zahl der Treffbereiche nach Extrapolation des linearen Astes auf die Ordinate.

Aus den Kernzählungen folgt aber, daß die Mutation #29 und Edein in unterschiedlicher Weise wirken, da Edein al-

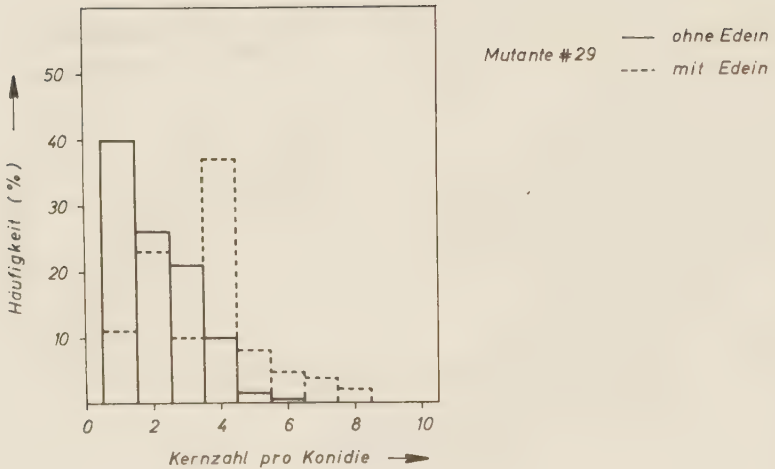


Abb. 23. Häufigkeitsverteilung der Anzahl von Kernen in Konidien der edeinresistenten Mutante #29, nach Anzucht der Myzelien ohne (—) bzw. mit (----) Edein.

lein die Kernzahl erhöht, die Mutation allein aber nicht. Trotzdem ist das dadurch erzielte Endergebnis, nämlich die Abflachung der UV-Inaktivierungskurven, in beiden Fällen das gleiche.

Wildtypkonidien, die mit Edein plattiert und anschließend belichtet wurden, weisen, wie schon erwähnt, eine starke Verminderung der Überlebensrate gegenüber Konidien, die im Dunkeln gelassen wurden, auf. Weitere Daten dazu sind

Tabelle 12

---

A. Wildtypkonidien, gewachsen in Vollmedium ohne Edein

---

|                                            | Dunkel         | Licht          |
|--------------------------------------------|----------------|----------------|
| Plattierung ohne Edein                     | $88,2 \pm 5,1$ | $84,3 \pm 2,8$ |
| Plattierung mit 150 $\mu\text{g}$ Edein/ml | $20,1 \pm 0,4$ | $2,8 \pm 0,1$  |

---

B. Wildtypkonidien, gewachsen in Vollmedium mit 150  $\mu\text{g}$  ed/ml

---

|                                            | Dunkel         | Licht          |
|--------------------------------------------|----------------|----------------|
| Plattierung ohne Edein                     | $73,9 \pm 4,7$ | $71,9 \pm 3,5$ |
| Plattierung mit 150 $\mu\text{g}$ Edein/ml | $20,9 \pm 0,9$ | $2,7 \pm 0,1$  |

---

Einfluß von Licht auf die Überlebensrate (in %) von Wildtypkonidien, plattiert auf Medium ohne bzw. mit 150  $\mu\text{g}$  Edein/ml. A. Wildtypkonidien, die in Vollmedium ohne Edein gewachsen waren. B. Wildtypkonidien, die in Vollmedium mit 150  $\mu\text{g}$  Edein/ml gewachsen waren. Mittelwerte und statistische Schwankungen aus je 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

---

in Tabelle 12 zusammengestellt. Dieser Effekt wurde oben als "Lichtsensibilisierung des unspezifischen Edeineffekts" bezeichnet. Er wird bei den Mutanten nicht beobachtet

Tabelle 13

---

A. Konidien der Mutante # 18, gewachsen in Vollmedium ohne Edein

---

|                                      | Dunkel         | Licht          |
|--------------------------------------|----------------|----------------|
| Plattierung ohne Edein               | $68,2 \pm 2,8$ | $69,3 \pm 2,1$ |
| Plattierung mit 200 $\mu$ g Edein/ml | $0,2 \pm 0,04$ | $0,2 \pm 0,04$ |

---

B. Konidien der Mutante # 29, gewachsen in Vollmedium ohne Edein

---

|                                      | Dunkel         | Licht          |
|--------------------------------------|----------------|----------------|
| Plattierung ohne Edein               | $65,2 \pm 0,1$ | $65,1 \pm 0,4$ |
| Plattierung mit 200 $\mu$ g Edein/ml | $13,9 \pm 0,3$ | $14,1 \pm 0,2$ |

---

Überlebensrate (in %) von Konidien edeinresistenter Mutanten, plattiert auf Medium ohne bzw. mit 200  $\mu$ g Edein/ml, mit bzw. ohne Licht. A. Konidien der Mutante # 18, die in Vollmedium ohne Edein gewachsen waren. B. Konidien der Mutante # 29, die in Vollmedium ohne Edein gewachsen waren. Mittelwerte und statistische Schwankungen aus je 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

---

(s. Tabelle 13). Die Ursache für den Effekt könnte sein:

1. eine Sensibilisierung der Wildtypzellen durch Licht für Edein. Es gibt Reaktionen bei *Neurospora crassa*, die

Tabelle 14

---

A. Wildtypkonidien, gewachsen in Vollmedium ohne Edein

---

|                                            | Dunkel         | Licht          |
|--------------------------------------------|----------------|----------------|
| Plattierung ohne Edein                     | $87,4 \pm 1,2$ | $85,0 \pm 0,2$ |
| Plattierung mit 150 $\mu\text{g}$ Edein/ml | $20,6 \pm 0,3$ | $20,2 \pm 0,1$ |

---

B. Wildtypkonidien, gewachsen in Vollmedium mit 150  $\mu\text{g}$  ed/ml

---

|                                            | Dunkel         | Licht          |
|--------------------------------------------|----------------|----------------|
| Plattierung ohne Edein                     | $84,2 \pm 1,2$ | $80,5 \pm 0,3$ |
| Plattierung mit 150 $\mu\text{g}$ Edein/ml | $20,1 \pm 0,2$ | $19,5 \pm 0,2$ |

---

Überlebensrate (in %) von Wildtypkonidien, plattiert auf Medium ohne bzw. mit 150  $\mu\text{g}$  Edein/ml. Die Platten wurden zuvor mit Weißlicht bestrahlt. A. Wildtypkonidien, die in Vollmedium ohne Edein gewachsen waren. B. Wildtypkonidien, die in Vollmedium mit 150  $\mu\text{g}$  Edein/ml gewachsen waren. Mittelwerte und statistische Schwankungen aus je 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

---

durch Licht beeinflusst worden, z. B. die Karotinoidbiosynthese in den Hyphen (Rau, Lindemann und Rau-Hund, 1968).  
 2. ein durch Licht entstandenes Abbauprodukt von Edein, welches toxischer als Edein selbst wirkt.

Um eine Entscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu treffen, wurden edeinhaltige Platten mit Weißlicht vorbestrahlt, anschließend mit Wildtypkonidien beschickt und diese sodann im Gelblicht weiter bebrütet. Die aus diesen Experimenten ermittelten Überlebensraten stimmen mit der Überlebensrate von Konidien, die auf unbestrahlten edeinhaltigen Platten aufgebracht wurden, überein (s. Tabelle 14). Daraus kann man schließen, daß eine etwaige Umwandlung von Edein durch Weißlicht nicht die Ursache des Effekts sein kann, zumindest keine außerhalb der Zellen erfolgende.

Die Tatsache, daß die Mutanten keine derartige Sensibilisierung zeigen (s. Tabelle 13), deutet auf eine genetische Steuerung des Effekts hin. An ihr müssen die in mutiertem Zustand Edeinresistenz bedingenden beiden Gene  $ed^R-1$  und  $ed^R-2$  beteiligt sein.

#### D. DISKUSSION

Im ersten Teil der vorstehenden Arbeit wurde versucht, Mutanten von *Neurospora crassa* zu gewinnen, welche resistent gegen das Antibiotikum Edein sind. Dazu wurden Konidien des Wildtyps mit einem geeigneten Mutagen behandelt. Die erhaltenen Isolate, als "Primärisolate" bezeichnet, zeigten bezüglich ihres Resistenzgrades starke Schwankungen, wenn sie nach vegetativer Vermehrung in verschiedenen Generationen geprüft wurden (Tabelle 2). Im Gegensatz dazu zeigten "Sekundärisolate", wie sie nach Rückkreuzung der "Primärisolate" mit dem Wildtyp erhalten werden können, nach vegetativer Vermehrung einen stets gleich bleibenden Resistenzgrad (Tabelle 3). Eine Erklärung für das unterschiedliche Verhalten der Isolate würde die Annahme bieten, daß die "Primärisolate" aus mehrkernigen Konidien hervorgingen, nach Mutagenese also möglicherweise heterokaryotisch waren. Die entstandenen Isolate hätten dann resistente und sensible Kerne in unterschiedlichen Zahlenverhältnissen, abhängig von den jeweiligen Kulturbedingungen, was zu unterschiedlichen Resistenzgraden führen könnte. Der Befund, daß die benutzten Mutanten rezessiv sind, schließt diese Erklärungsmöglichkeit aus. Er besagt, daß nur homokaryotische Isolate in die Versuche eingingen. Auch eine zweite Annahme, wonach die Primärisolate Mischpopulationen waren, scheidet aus, da die Primärisolate nach vegetativer Vermehrung durch Ausplattierung auf Medium mit Edein gerei-

nigt wurden. Die Ursache der beobachteten Schwankungen muß daher vorerst unerklärt bleiben.

Bei zwei der resistenten "Sekundärisolate" (#18 und #29) wurde eine Kartierung mittels Kreuzungsanalyse durchgeführt. Die beiden Mutationsorte  $ed^R-18$  bzw.  $ed^R-29$  liegen danach auf Kopplungsgruppe VI, und zwar  $ed^R-18$  zwischen den Loci  $ad-1$  und  $pan-2$  und  $ed^R-29$  19,4 Rekombinationseinheiten links des  $ad-1$  Locus. Die genaue Lokalisierung der Mutation #29 kann jedoch noch nicht als endgültig betrachtet werden, da bei der Kreuzung mehr edeinresistente als edeinsensible Isolate erhalten wurden. Dies galt sowohl für die Parentaltypen als auch für die Rekombinanten. Desgleichen war auch der zwischen den Loci  $ad-1$  und  $pan-2$  gefundene Abstand in Rekombinationseinheiten größer als von Case und Giles (1958) angegeben. Zwei verschiedene Erklärungen scheinen dafür möglich: a) edeinsensible Ascosporen könnten eine geringere Keimfähigkeit als edeinresistente haben; b) edeinsensible Sporen könnten Frühkeimer sein, also ohne Temperaturschock zu Myzelien auswachsen, und daher in den Versuchen, gemeinsam mit Myzelien, welche auf Konidien zurückgingen, eliminiert worden sein. Beides würde im Endeffekt mehr edeinresistente als edeinsensible Isolate liefern.

Die Prüfung von 345 Ascosporen aus der Rückkreuzung eines edeinresistenten Sekundärisolates (#29,  $ad-1$ ,  $pan-2$ , A) mit dem Wildtyp ergab, daß insgesamt 253 Sporen keimten, ein Teil schon ohne, der Rest erst mit Temperaturschock.

Jene Isolate, die ohne Temperaturschock keimten (110), waren überwiegend (73 von 110) edeinsensibel. Die erst nach Schockbehandlung keimenden (143) erwiesen sich zum überwiegenden Teil als edeinresistent (89 von 143). Demnach ist Erklärungsmöglichkeit b) die wahrscheinlichere.

Wie im Ergebnisteil gezeigt wurde, ist der phänotypische Resistenzgrad der edeinresistenten Mutanten meist nur gering (Überlebensrate mit Edein ca. 20 % für die Mutante # 29 und ca. 0,2 % für die Mutante # 18). Eine Erklärung dafür könnte in der Reversion solcher Resistenzmutationen zum sensiblen Genotyp des Ausgangsstammes gesucht werden. Tatsächlich haben Najer und Goldfinger (1969) bei edeinresistenten Mutanten von *E. coli* eine sehr hohe Reversionsrate gefunden. Ausgehend von einem homokaryotischen  $ed^R$ -Isolat und unter Voraussetzung der belegten Dominanz des  $ed^S$ -Allels würde ein solches Isolat bei häufiger Reversion  $ed^R \rightarrow ed^S$  viele phänotypisch sensible und wenige phänotypisch resistente Zellen liefern. Diese Erklärungsmöglichkeit muß experimentell geprüft werden, um sie gegenüber anderen Denkmöglichkeiten abzugrenzen. Eine solche andere, zunächst formale Denkmöglichkeit wäre, daß die Mutation zur Edeinresistenz nicht ein Strukturgen, sondern ein genetisches Steuerelement betrifft, welches während der Konidienkeimung wirkt. Dieses könnte z. B. durch die Mutation so verändert sein, daß die zugehörigen Strukturgene bei der Keimung der Konidien meist angeschaltet werden, und dann den Wildphänotyp realisieren, seltener, ohne Anschaltung, würde der mutierte Phänotyp entstehen. Es ist hier an

Strukturgene für die Bildung einer Permease zur Aufnahme des Edeins in die Zellen gedacht. Die Bildung einer solchen Permease während der Keimung der Konidien würde zur Abtötung der Zellen in Gegenwart von Edein führen. Daß die edeinresistente Mutante #29 ( $ed^R-2$ ) eine "Transportdefekt" Mutante (Permease negativ) sein könnte, wurde von Wagenmann, Klingmüller und Neupert (1974) aufgrund der pleiotropen Resistenz dieser Mutante gegen Edein bei "in vivo" Messungen zur DNS-, RNS- und Protein-Synthese sowie aufgrund der Rezessivität des betreffenden Allels bereits vorgeschlagen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die Mutation zur Edeinresistenz, im Gegensatz zu dem Antibiotikum Edein selbst, keinen Einfluß auf die Rekombinationshäufigkeit hat, sofern die Kreuzungen mit den resistenten Mutanten ohne Edein durchgeführt werden. Andererseits konnte gezeigt werden, daß sowohl die Mutation allein, wie auch Edein, vergleichbare Änderungen in der relativen Anzahl der in 3 verschiedenen Rubriken erhaltenen Rekombinanten bewirken. Die diese Rubriken kennzeichnenden Rekombinanten waren ihrer möglichen Entstehungsweise nach als "Nicht-Crossover", "einfaches Crossover" und "doppeltes Crossover" Rekombinanten bezeichnet worden. Unter der Wirkung der Mutation zur Edeinresistenz allein bzw. allein durch Edein war die Anzahl der "Nicht-Crossover" Rekombinanten vermindert, während die Anzahl der "Crossover" Rekombinanten gesteigert war. In der Annahme, daß "Nicht-Crossover" Rekombinanten auf Gen-Konversion, und daß "Crossover" Rekombinanten auf reziproke Rekombinanten zurückgehen, ist daraus abzuleiten,

daß diesen beiden Ereignissen verschiedene molekulare Mechanismen zugrunde liegen. Diese Möglichkeit haben auch andere Autoren aufgrund von im Prinzip ähnlichen Befunden (Whitehouse, 1963, 1965; Holliday, 1964, 1968, 1970; Whitehouse und Hastings, 1965; Taylor, 1967; Stahl, 1969; Paszewsky, 1970; Sobell, 1973) diskutiert.

Es erscheint zunächst als Widerspruch, daß die Mutation zur Edeinresistenz bei Abwesenheit von Edein keinen Einfluß auf die Rekombinationshäufigkeit, wohl aber auf die Art des Rekombinationsereignisses haben sollte. Aus der Tatsache jedoch, daß 1. die Mutation zur Edeinresistenz rezessiv ist und 2. z. B. bei dem Isolat # 29 nur etwa 20 % der Zellen phänotypisch resistent reagieren, muß gefolgert werden, daß zur phänotypischen Ausprägung der Mutation in Kreuzungen, Homozygotie für das  $ed^r$  Allel und zusätzlich der Selektionsdruck des Edeins nötig ist. Diese Voraussetzung war in den Kreuzungen ohne Edein nicht erfüllt.

Eine Erklärung für die Verschiebung in der relativen Häufigkeit bestimmter Rekombinantenklassen ohne Edein wäre, daß möglicherweise diese Verschiebung im Gegensatz zur Rekombinationshäufigkeit nur vom resistenten Genotyp und nicht vom resistenten Phänotyp verursacht wird.

Eine Steigerung der Rekombinationshäufigkeit durch Edein wurde auch für Bakterien beschrieben (Piekarowicz, Groniowska, Kunicki-Goldfinger, 1969; Wlodarczyk, Najer, Piekarowicz und Kunicki-Goldfinger, 1969). Hinsichtlich

des Wirkungsmechanismus ist ein Vergleich mit dem von Mitomycin C bzw. 5-Fluordeoxyuridin naheliegend, die ebenfalls eine Erhöhung der Rekombinationshäufigkeit bedingen (Esposito und Holliday, 1964; Holliday, 1964; Wolff und De Serres, 1967). Diese Stoffe blockieren die DNS-Synthese (Shiba, Terawaki, Taguchi und Kawamata, 1959; Ben-Porat, Reissig und Kaplan, 1964; Williamson und Scopes, 1962), ebenso wie Edein (Kurylo-Borowaka, 1964; Wagenmann, Klingmüller und Neupert, 1974). Die Autoren, die mit Mitomycin C und 5-Fluordeoxyuridin gearbeitet haben, diskutieren die Möglichkeit, daß die Hemmung der DNS-Synthese eine Verlängerung jener Phase der Meiosis nach sich zieht, in welcher die Rekombination bevorzugt abläuft, was eine Steigerung der Rekombinationshäufigkeit bedingen könnte. Das gleiche könnte für Edein gelten.

Was die Steigerung der Rekombinationshäufigkeit bei Kreuzungen betrifft, die zwischen edeinresistenten Mutanten in Gegenwart von Edein durchgeführt wurden, so liegen die Dinge hier anders. Da die DNS-Synthese dieser Mutanten nach den Untersuchungen von Wagenmann, Klingmüller und Neupert (1974) resistent gegen Edein ist, kann das Edein hier nicht über die DNS Einfluß auf das Rekombinationsgeschehen gewinnen. Hier wirkt also entweder nur das mutierte Allel, das Edein aber nicht, wobei nicht ausgeschlossen ist, daß das mutierte Allel im gleichen Sinn wie zuvor das Edein wirken könnte, oder das Edein beeinflusst das Kreuzungsergebnis über einen anderen Weg als jenen einer Hemmung der DNS-Synthese.

Im dritten Teil der Arbeit wurde versucht, erste Hinweise auf die molekularen Ursachen der Wirkung der mutierten Allele zu erhalten. In diesem Zusammenhang wurde die Nukleaseaktivität, die Photoreaktivierung und die Dunkel-Reparatur der edeinresistenten Mutanten geprüft. Die Nukleaseaktivität dieser Mutanten ist gegenüber dem Wildtyp kaum geändert. Die Mutante # 29 (mit der die Versuche zur Beeinflussung der Rekombination durchgeführt wurden) zeigt eine verbesserte Dunkel-Reparatur. Da zur Dunkel-Reparatur Exzision und Rekombination beitragen können, die Nukleaseaktivität aber kaum verändert war, scheint eine Änderung in der Aktivität von Polymerase I oder Ligase (beide sind, neben Nukleasen, bei *E. coli* an der Dunkel-Reparatur beteiligt) für den vorliegenden Fall denkbar. Untersuchungen zur Klärung dieser Frage wurden nicht durchgeführt. Deshalb muß offen bleiben, ob hier das eine oder das andere dieser beiden Enzyme oder beide zusammen für die verbesserte Dunkel-Reparatur und die beobachtete Steigerung der Rekombinationshäufigkeit verantwortlich sind. Von Interesse ist hier, daß nach neueren Untersuchungen von Kurylo-Borowska (1975) Edein die Polymerasen II und III von *E. coli* hemmt, nicht jedoch die Polymerase I. Falls der Wirkungsmechanismus von Edein bei Neurospora der selbe wäre, würde dies für die hier erwähnten Versuche eine Nichtbeeinflussung der Dunkel-Reparatur durch Edein bedeuten, mindestens was die Polymerase I betrifft. Im Widerspruch dazu wurde eine Beeinflussung der Überlebensrate im Dunkeln gefunden, mindestens dann, wenn

die Konidien von Kulturen stammten, die mit Edein angezüchtet worden waren.

Dieser Befund machte die nähere Analyse der zum Überleben im Dunkeln beitragenden Parameter wünschenswert. Messungen des jeweiligen Zellvolumens und Kernfärbungen an Konidien aller 3 Stämme ergaben, daß die Zellen nach Anzucht mit Edein voluminöser sind und mehr Kerne enthalten als nicht unter Edeineinfluß gewachsene Kontrollen.

Die Zunahme der Kernzahl bzw. der Treffbereiche pro Zelle muß eine generelle Verringerung der UV-Empfindlichkeit dieser Zellen nach sich ziehen. In diesem Fall brauchte also die Dunkel-Reparatur nicht beeinflußt zu sein.

Der Vergleich des Zellvolumens und der Kernzahl von Konidien der Mutante #29, die ohne Edein gezüchtet wurden, mit den entsprechenden Parametern von Wildtypkonidien, brachte jedoch keine Unterschiede. Dennoch ist die UV-Empfindlichkeit der Mutante auch ohne Edein deutlich geringer als beim Wildtyp. Die Verringerung der Empfindlichkeit dürfte also, zumindest in diesem Fall, ausschließlich durch eine erhöhte Aktivität gewisser an der Exzisions- oder Rekombinations-Reparatur beteiligter Enzyme verursacht sein. Für die Fälle, wo Konidien von edeinhaltigen Kulturen benutzt wurden, ist auf einen Beitrag dieses Mechanismus zur Gesamtabflachung des Kurvenverlaufs zu schließen.

## E. ZUSAMMENFASSUNG

1. Durch Behandlung von Wildtypkonidien des Schimmelpilzes *Neurospora crassa* mit 1-methyl-3 nitro-1-nitroso-guanidin konnten edeinresistente "Primärisolate" gewonnen werden. Sie zeigen nach vegetativer Vermehrung bezüglich ihres Resistenzgrades große Instabilität. Dagegen sind die aus Rückkreuzungen dieser Isolate mit dem Wildtyp erhaltenen "Sekundärisolate" sehr stabil.

2. Zwei Sekundärisolate, die Mutanten #18 bzw. #29, wurden mittels Kreuzungsanalysen kartiert. Die entsprechenden Mutationen, als  $ed^R-1$  (Isolat #18) und  $ed^R-2$  (Isolate #29) bezeichnet, kennzeichnen 2 verschiedene Loci auf Kopplungsgruppe VI.

3. Der phänotypische Resistenzgrad dieser beiden Mutanten, gemessen als Kolonienbildung in Medium mit 200  $\mu$ g Edein/ml, und bezogen auf Plattierung ohne Edein, ist ca. 20 % für die Mutante #29 und ca. 0,2 % für die Mutante #18. Der Resistenzgrad ist abhängig vom Alter der Kulturen und der Edeinkonzentration im Medium. Er ist höher bei Konidien aus Kulturen, die mit Edein herangezogen wurden. Bei Zwischenbebrütung solcher Kulturen auf Medium ohne das Antibiotikum nimmt er ab.

4. In Heterokaryon-Testen erwies sich der resistente Genotyp beider Mutanten gegenüber dem sensiblen Wildtyp als rezessiv.

5. Die Wirkung der Mutation  $ed^R-2$  zur Edeinresistenz wie auch die Wirkung von Edein allein auf die genetische Rekombination wurde geprüft. Dazu wurden Kreuzungen zwischen edeinsensiblen bzw. edeinresistenten Stämmen, jeweils in Abwesenheit bzw. in Gegenwart von Edein (0 - 750  $\mu\text{g}$  Edein/ml) durchgeführt. Als genetische Marken wurden  $ylo-1$ ,  $ad-1$ ,  $pan-2$  ( $B_3$  und  $B_5$ ) und  $tryp-2$ , alle auf der Kopplungsgruppe VI, benutzt.

6. In Abwesenheit von Edein wurden eine Häufigkeit von ca. 6 - 7 % für die intergene Rekombination und ca. 0,4 % für die interallele Rekombination erhalten, sofern beide Kreuzungspartner entweder edeinsensibel oder homoallel edeinresistent waren. Bei Kreuzungen in Gegenwart von Edein erhöht sich die Häufigkeit der Rekombinanten proportional zur Edeinkonzentration bis 200  $\mu\text{g}$  Edein/ml (ca. 12 % für die intergene Rekombination und ca. 1 % für die interallele Rekombination mit 200  $\mu\text{g}$  Edein/ml). Ab dieser Konzentration ist eine Steigerung der Rekombinationshäufigkeit nicht mehr zu beobachten.

7. Bei den in den einzelnen Kreuzungen erhaltenen  $ad^+$ ,  $tryp^+$  Prototrophen (intergene Rekombinanten) wurde die Verteilung der benutzten Außenmarken untersucht. Weder die Mutation # 29 noch Edein beeinflussten diese Verteilung. In gleicher Weise wurden die bei den verschiedenen Kreuzungen erhaltenen  $pan^+$  Prototrophen (interallele Rekombinanten) geprüft. Unter der Wirkung der Mutation # 29 zur Edeinresistenz bzw. unter dem Einfluß von Edein allein war die Anzahl von Crossover-Rekombinanten gegen-

über Nicht-Crossover (Gen-Konversion)-Rekombinanten gesteigert. Durch Kombination beider Faktoren (Mutation zur Edeinresistenz und Edein) wurde die Anzahl der Doppel-Crossover-Rekombinanten (Ereignisse außerhalb des pan Locus) zugunsten der Einfach-Crossover-Rekombinanten vermindert.

8. Die Nukleaseaktivität beider Mutanten (# 18 und # 29) wurde durch Messung des Myzelwachstums in RNS-haltigem Medium (extrazelluläre Nukleasen) und durch Messung des Abbaus ringförmiger DNS in Zellextrakten bestimmt. Die Nukleaseaktivität beider Mutanten ist gegenüber dem Wildtyp kaum geändert.

9. In Bestrahlungsversuchen mit UV wurde die Photoreaktivierung bzw. die Dunkel-Reparatur der beiden edeinresistenten Mutanten in Abwesenheit bzw. in Gegenwart von Edein geprüft. Für Konidien, die von Kulturen ohne Edein stammten, zeigten die Photoreaktivierung und Dunkel-Reparatur der Mutante # 18 gegenüber dem Wildtyp keine Änderung. Dagegen war die Dunkel-Reparatur der Mutante # 29 gegenüber jener der Mutante # 18 und des Wildtyps scheinbar verbessert. Die Photoreaktivierung der Mutante # 29 war unverändert. Wurden Konidien von Kulturen benutzt, die mit Edein angezogen worden waren, so schien die Dunkel-Reparatur in allen Fällen verbessert.

10. Messungen der Zellvolumina und Kernfärbungen an Konidien des Wildtyps und der Mutante # 29, die von Medium mit bzw. ohne Edein gewonnen wurden, zeigen, daß die Zel-

len beider Stämme nach Wachstum in edeinhaltigem Medium ein größeres Volumen und mehr Kerne besitzen. Damit trägt zu der unter 9. beschriebenen scheinbaren Verbesserung der Dunkel-Reparatur bei Konidien des Wildtyps und der Mutante # 29, die in Edein gezüchtet wurden, eine Erhöhung der Zahl der Treffbereiche zumindest bei.

11. Die Überlebensrate von Wildtypkonidien, die in Gegenwart von Edein plattiert und anschließend belichtet wurden, ist gegenüber Kontrollplattierungen, die im Dunkeln gehalten wurden, stark vermindert. Diese "Lichtsensibilisierung des unspezifischen Edeineffekts" tritt bei den edeinresistenten Mutanten nicht auf.

F. LITERATURVERZEICHNIS

Angerbauer, K. N. (1972)

3-O-Methylglucose-Transport bei *Neurospora crassa*: Untersuchungen über den Einfluß von Konidienalter und Aushungerung

Zulassungsarbeit, unveröffentl., Genetisches Institut der Universität München

Ben-Porat, T., Reissig, M. und Kaplan, A. S. (1961)

Effect of mitomycin C on the synthesis of infective virus and deoxyribonucleic acid in pseudorabies virus-infected rabbit kidney cells

Nature (Lond.) 90, 33-34

Beetz, B. und Klingmüller, W. (1973)

High recombination rates in presence of edeine

Naturwissenschaften 60, 301-302

Borowski, E., Chmara, H. und Jareczek-Morawska, E. (1966)

The antibiotic edeine. VI. Paper and thin-layer-chromatography of components of the edeine complex

Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 130, 560-563

Case, M. E. und Giles, N. H. (1958)

Evidence from tetrad analysis for both normal and aberrant recombination between allelic mutants in *Neurospora*

Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 44, 378-390

Case, M. E. und Giles, N. H. (1958)

Recombination mechanism at the pan-2 locus in *Neurospora crassa*

Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 23, 119-135

Esposito, R. E. und Holliday, R. (1964)

The effect of 5-fluorodeoxyuridine on genetic replication and mitotic crossing-over in synchronized cultures of *Ustilago maydis*

Genetics 50, 1009-1017

Hammerl, H. und Klingmüller, W. (1972)

Influence of UV light on gene conversion in *Neurospora*  
Z. Naturforsch. 27 b, 68-72

Hettinger, T. P., Kurylo-Borowska, Z. und Craig, L. (1968)

Edeine. III. The composition of the antibiotic peptid edeine

Biochemistry 7, 4153-4160

Hettinger, T. P. und Craig, L. (1970)

Edeine. IV. Structures of the antibiotic peptides edeines A<sub>1</sub> and B<sub>1</sub>

Biochemistry 9, 1224-1232

Hierowski, M. und Kurylo-Borowska, Z. (1965)

Effect of edeine on synthesis of polyphenylalanine in a cell-free system

Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 95, 578-589

Holliday, R. (1964)

The induction of mitotic recombination by mitomycin C in  
Ustilago and Saccharomyces  
Genetics 50, 323-335

Holliday, R. (1964)

A mechanism for gene conversion in fungi  
Genet. Res. 5, 282-304

Holliday, R. (1968)

Genetic recombination in fungi  
Replication and recombination of genetic material, 157-174  
Eds.: W. J. Peacock und R. D. Brock, Australian Academy of  
Sciences, Canberra

Ishikawa, T., Toh-E, A., Uno, I. und Hasunuma, K. (1969)

Isolation and characterization of nuclease mutants in Neu-  
rospora crassa  
Genetics 63, 75-92

Ishikawa, T. und Hasunuma, K. (1971)

Properties of two nuclease genes in Neurospora crassa  
Genetics 70, 371-384

Kachel, V. (1971)

Verbesserung des Coulter-Meßverfahrens  
Umschau, Heft 20, 746-747

Kurylo-Borowska, Z. (1962)

On the mode of action of edeine

Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 61, 897-902

Kurylo-Borowska, Z. (1964)

On the mode of action of edeine. Effect of edeine on the  
bacterial DNA

Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 87, 305-313

Kurylo-Borowska, Z. und Tatum, E. L. (1966)

Biosynthesis of edeine by *Bacillus brevis* Vm<sup>4</sup> in vivo and  
in vitro

Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 114, 206-209

Kurylo-Borowska, Z. und Szer, W. (1972)

Inhibition of bacterial DNA synthesis by edeine. Effect  
on *Escherichia coli* mutants lacking DNA polymerase I

Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 287, 236-245

Kurylo-Borowska, Z. (1975)

Antibiotics, vol. III. Mechanism of action of antimicro-  
bial and antitumor agents, 129-140

Eds.: J. W. Corcoran und F. H. Halm, Springer Verlag

Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. und Randall,  
R. J. (1951)

Protein measurement with the folin phenol reagent

J. Biol. Chem. 193, 265-275

Neuhäuser, A., Klingmüller, W. und Kaudewitz, F. (1970)  
Selektion actidionresistenter Mutanten bei *Neurospora*  
*crassa* sowie ihre genetische und biochemische Analyse  
Molec. Gen. Genet. 106, 180-194

Obrig, T., Irvin, J., Culp, W. und Hardesty, B. (1971)  
Inhibition of peptide initiation on reticulocyte ribo-  
somes by edeine  
Europ. J. Biochem. 21, 31-41

Paszewsky, A. (1970)  
Gene conversion: observations on the DNA hybrid models  
Genet. Res. 15, 55-64

Piekarowicz, A., Groniowska, E. und Kunicki-Goldfinger, W.  
(1969)

The mechanism of conjugation and recombination in bacte-  
ria. V. Effect of edeine on  $F^+$  cells  
Acta Microbiol. Polon. 1 (18), 15-22

Rau, W., Lindemann, I. und Rau-Hund, A. (1968)  
Untersuchungen über die lichtabhängige Carotinoidsynthese  
III. Die Farbstoffbildung von *Neurospora crassa* in Sub-  
merskultur  
Planta (Berl.) 80, 309-316

Shiba, S., Terawaki, A., Taguchi, T. und Kawamata, J. (1959)  
Selective inhibition of formation of deoxyribonucleic acid  
in *Escherichia coli* by mitomycin C  
Nature (Lond.) 183, 1056-1057

Sobell, H. (1973)

Symmetry in protein-nucleic acid interaction. IV. Mechanism for genetic recombination

Advances in Genetics 17, 424-464

Somers, C. E., Wagner, R. P. und Hsu, T. C. (1960)

Mitosis in vegetative nuclei of *Neurospora crassa*

Genetics 45, 801-810

Stahl, F. W. (1969)

One way to think about gene conversion

Genetics, suppl. 61 (1), 1-13

Taylor, J. H. (1967)

Patterns and mechanism of genetic recombination

Molecular Genetics, Part II, 95-135

Ed.: J. H. Taylor, Academic Press, New York und London

Terry, C. E., Kilbey, B. T. und Howe, H. B. (1967)

The nature of photoreactivation in *Neurospora crassa*

Radiat. Res. 30, 737-747

Threlkeld, S. F. H., Newcombe, K. und Mylyk, O. M. (1969)

Non-reciprocal recombination at the *pan-2* locus in *Neurospora crassa*.

Can. J. Genet. Cytol. 11, 54-59

Vogel, H. J. (1956)

A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N.)

Microbial Genet. Bull. 13, 42-43

Wagenmann, M., Klingmüller, W. und Neupert, W. (1974)

Ecdysone inhibition and resistance in *Neurospora*

Arch. Microbiol. 100, 105-114

Westergaard, M. und Mitchell, H. K. (1947)

*Neurospora* V. A synthetic medium favouring sexual reproduction

Amer. J. Bot. 34, 573-577

Whitehouse, H. L. K. (1963)

A theory of crossing-over by means of hybrid deoxyribonucleic acid

Nature 199, 1034-1040

Whitehouse, H. L. K. (1965)

Crossing-over

Sci. Progr. 53, 285-296

Whitehouse, H. L. K. und Hastings, P. J. (1965)

The analysis of genetic recombination on the polaron hybrid DNA model

Genet. Res. 6, 27-92

Whitehouse, H. L. K. (1970)

The mechanism of genetic recombination

Biol. Rev. 45, 265-315

Williamson, D. H. und Scopes, A. W. (1962)

Cell division and the synthesis of macromolecules in synchronously dividing cultures of *Saccharomyces cerevisiae*

Proc. 22nd Intern. Congr. Intern. Union Physiol. Sci.,  
Leiden 1, 759-765

Wlodarczyk, M., Najer, A., Piekarowicz, A. und Kunicki-Goldfinger, W. (1969)

The mechanism of conjugation and recombination in bacteria.

VII. Further characteristics of recombination-deficient Hfr mutants

Acta Microbiol. Polon. 1 (18), 123-124

Wolff, S. und De Serres, F. J. (1967)

Chemistry of crossing-over

Nature (Lond.) 213, 1091-1092

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. W. Klingmüller für die großzügige Förderung und Anleitung,

Herrn Prof. Dr. F. Kaudewitz für die freundliche Aufnahme im Institut,

Herrn Doz. Dr. G. Hobom für die Überlassung von  $\lambda$  dv-DNS und nicht zuletzt Herrn Dipl. Ing. Dr. V. Kachel für die Durchführung der Versuche zur Volumenbestimmung.

Frl. D. Sell und Fr. R. Reimer danke ich für die Anfertigung der Abbildungen und Photographien.



Lebenslauf:

Am 27. 12. 1945 wurde ich, Maria Leonor Hermenegildo Teles Grilo in Chaves, Portugal, als Tochter des Rechtsanwaltes Carlos Emilio Tenreiro Teles Grilo und seiner Frau Maria d'Assunção Hermenegildo Teles Grilo geboren. Von 1952 bis 1956 besuchte ich die Volksschule und von 1956 bis 1963 das Gymnasium in Chaves. Im Juli 1963 legte ich mein Abitur ab. Danach studierte ich an den Universitäten Coimbra und Porto Pharmazie von 1963 bis 1969.

Dieses Studium umfaßt auch Kurse in Mikrobiologie und Biochemie. Im Januar 1970 beendete ich mein Studium mit dem Staatsexamen in Pharmazie. 1970 kam ich nach Deutschland und erlernte die deutsche Sprache. Im Juni 1971 begann ich meine Promotionsarbeit unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Walter Klingmüller am Genetischen Institut der Universität München.









